ÜBER DEN NACHWEIS VON LEUKOZYTENMEDIATOREN IM SERUM VON EXPERIMENTELL MIT TRYPANOSOMEN INFIZIERTEN RINDERN

Diss München
1984

Georg Hauner

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534901_0038

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr)
und dem Institut für
Blutgruppen- und Resistenzforschung der Tierzuchtforschung e.V.
München
(Wissenschaftlicher Leiter: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr)

Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. D.O. Schmid

ÜBER DEN NACHWEIS VON LEUKOZYTENMEDIATOREN IM SERUM VON EXPERIMENTELL MIT TRYPANOSOMEN INFIZIERTEN RINDERN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Georg Hauner
aus
Germering

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät

der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. W. Leidl
Referent:	Prof. Dr. D.O. Schmid
Korreferent:	Prof. Dr. H.K. Dennig

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1. Mediatoren der zellulären Immunität	2
2.2. Lymphozytenmediatoren und ihre Bedeutung unter besonderer Berücksichtigung der Migrationshemmung im Serum	7
2.3. Zelluläre Immunreaktionen bei der Trypanosomiasis und Trypanotoleranz	11
3. Eigene Untersuchungen	22
3.1. Methodik	22
3.1.1. Versuchstiere	22
3.1.2. Serumproben zur Untersuchung auf ihre Hemmungsaktivität im Migrationstest	24
3.1.3. Zielzellen für den Migrationstest	25
3.1.4. Der Migrationshemmungstest	28
3.1.4.1. Technik	28
3.1.4.2. Auswertung	31
4. Ergebnisse	34
4.1. Erste Versuchsreihe	35
4.2. Zweite Versuchsreihe	43
4.3. Dritte Versuchsreihe	49
4.4. Hämatologische Untersuchungen	55

Seite

5. Diskussion 60

5.1. Besprechung der Methodik 60

5.2. Besprechung der Ergebnisse 75

6. Zusammenfassung 100

7. Summary 102

8. Literaturverzeichnis 104

1. Einleitung

Nach Stimulierung von Lymphozyten kommt es zur Bildung von Lymphokinen, die als Leukozytenmediatoren das Immunsystem beeinflussen. Die Lymphokine lassen sich in vitro über stimulierte Lymphozyten in Zellkulturüberständen nachweisen und funktionell und biochemisch charakterisieren. Einer Bildung von Lymphokinen , die die Migration von Leukozyten hemmen, wird für zelluläre Immunreaktionen eine große Bedeutung beigemessen.
Eine Reihe von Versuchsergebnissen an kleinen Laboratoriumstieren sprechen dafür, daß Lymphokine in vivo als Leukozytenmediatoren die Reaktionen des zellulären Immunsystems regulieren. Bei der Auseinandersetzung mit Antigenen ist nicht nur die Bildung spezifischer Antikörper zu erwarten, sondern auch die Bildung von Mediatoren, die die zelluläre Immunität beeinflussen. Es ist naheliegend, daß im Serum von mit Trypanosomen infizierten Tieren derartige Zellmediatoren nachgewiesen werden können.
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Testsystem zu entwickeln, mit dessen Hilfe über den Nachweis in vivo gebildeter, die Zellmigration beeinflussender Mediatoren zelluläre Immunreaktionen beim Rind erfaßt werden können. Durch die Untersuchung der Seren von mit Trypanosomen infizierten Rindern auf Leukozytenmediatoren sollte im Hinblick auf die großen wirtschaftlichen Verluste durch die Trypanosomiasis ein Beitrag zur Bedeutung der zellulären Immunität bei der experimentellen Trypanosomiasis des Rindes geleistet werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Mediatoren der zellulären Immunität

Das Immunsystem der Säugetiere läßt sich in ein humorales und zelluläres Immunsystem gliedern. Träger der humoralen und der zellulären Immunität sind Immunzellen, die sich aus Stammzellen des Knochenmarks entwickeln. Während die B-Lymphozyten als Vorläufer der Antikörper-produzierenden Plasmazellen dem humoralen System zugerechnet werden, zählen zum zellulären Immunsystem außer den T-Lymphozyten mit ihren verschiedenen Subpopulationen auch noch die Monozyten bzw. Makrophagen und die polymorphkernigen Leukozyten. Eine Trennung in ein humorales und zelluläres Immunsystem wird zwar als notwendig erachtet, doch darf sie nicht absolut gesehen werden, da die beiden Systeme in vieler Hinsicht voneinander abhängig sind und sich gegenseitig regulierend beeinflussen (BENDTZEN u. BENDIXEN 1980, BERTRAMS u. RITTNER 1981, KATZ 1982). Dies gilt in ganz besonderem Maße für die Lymphozytensubpopulationen (MAYR et al. 1983).

Im Rahmen der zellulären Immunabwehr kommt es nach entsprechender Stimulierung zur Bildung von löslichen Mediatorstoffen, die je nachdem, von welchen Zellen sie gebildet werden, als Lymphokine (von Lymphozyten), Monokine (von Monozyten) oder Zytokine (von anderen Zellen, besonders Fibroblasten) bezeichnet werden (WAKSMAN u. NAMBA 1976). Durch die Wirkung dieser Mediatoren wird die Funktion der Zellen im zellulären Immunsystem reguliert. Die Aktivität der Mediatorstoffe kann in aufwendigen, biologischen Testverfahren erfaßt werden. Die Benennung der Lymphokine

erfolgt im allgemeinen nach der Funktion, die sie ausüben. Man kann davon ausgehen, daß die Fähigkeit zur Bildung von Lymphokinen genetisch determiniert ist (ADELMAN et.al. 1978, BERGSTRAND 1979, GILL u. KUNZ 1980, NETA et al. 1982, CARUSO u. BELLINA 1983).

Es ist heute noch nicht genau bekannt, ob es sich bei der Vielzahl der beschriebenen Mediatoren tatsächlich auch um verschiedene Stoffe handelt, oder ob eine relativ geringe Zahl solcher Stoffe über eine ganze Reihe unterschiedlicher Wirkungen auf bestimmte Zellen verfügt (WAKSMAN u. NAMBA 1976). HÜBNER et al. (1980) konnten in Kulturüberständen von mit Con A stimulierten Lymphozyten die Aktivität vier verschiedener Lymphokine biochemisch eindeutig voneinander abgrenzen. NETA et al. (1981) haben in verschiedenen Mäuseinzuchtstämmen nach Sensibilisierung der Tiere und anschließender Stimulierung mit Antigenen eine unterschiedlich starke Aktivität von sechs verschiedenen Lymphokinen im Serum dieser Tiere beobachtet. Lediglich die Höhe der Titer von MIF (Migration Inhibitory Factor) und IF II (Interferon Typ II) korrelierten in allen Mäusestämmen miteinander. Die Autoren schließen daraus, daß die Ausschüttung der untersuchten Lymphokine in vivo unter getrennter genetischer Kontrolle steht und ihre stoffliche Grundlage aus diesem Grund wahrscheinlich auch unterschiedlich sein müsse. Aus der positiven Korrelation des Titerverlaufs von MIF und IF II wird geschlossen, daß diese beiden Aktivitäten gemeinsam genetisch determiniert werden; es kann nicht ausgeschlossen werden, daß es sich bei den beiden Aktivitäten um unterschiedliche Wirkungen ein und der selben Substanz handelt.

Zur Funktionsprüfung des zellulären Immunsystems können die Lymphozyten in vitro in geeigneter Weise stimuliert und ihr Reaktionsvermögen entweder direkt durch Messung der Proliferation oder indirekt durch Bestimmung der in vitro von ihnen gebildeten Mediatorenaktivität ermittelt werden.

Bestimmte Mediatoren beeinflussen die Migration von Zellen. LIF (Leukocyte Migration Inhibitory Factor) hemmt spezifisch die ungerichtete Wanderung der Granulozyten, jedoch nicht die Migration anderer Zellen, wie beispielsweise der Makrophagen (FEDERLIN et al. 1971, GAINES et al. 1972, CLAUSEN 1973a, ROCKLIN 1974, HOFFMAN et al. 1975, FASSAS et al. 1979). Durch LEF (Leukocyte Migration Enhancing Factor) wird die Granulozytenwanderung beschleunigt (SOBORG 1968, WEISBART et al. 1974). Ein dritter Faktor, NIF-T (Neutrophil Migration Inhibition Factor von T-Lymphozyten) muß in die Überlegung mit einbezogen werden, da er nur an Hand biochemischer Untersuchungsmethoden von LIF unterschieden werden kann (WEISBART et al. 1982).

LIF-Aktivität wurde bislang in Kulturüberständen von Lymphozyten nachgewiesen, die mit einem spezifischen Antigen stimuliert wurden, gegen das die Lymphozytendonoren sensibilisiert waren, sowie nach unspezifischer Stimulierung der Lymphozyten mit Pflanzenlektinen wie beispielsweise Phytohämagglutinin oder Concanavalin A (ROCKLIN 1975). Lymphozyten konnten außerdem durch Antigen-Antikörper-Komplexe (NEVILLE u. LISCHNER 1977) und in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) zur Bildung des LIF-Faktors stimuliert werden (CLAUSEN 1972).

Von welchen Zellen LIF gebildet wird, steht noch nicht fest. CHESS et al. (1975) haben festgestellt, daß nach Stimulierung mit verschiedenen Antigenen LIF von T- und B-Lymphozyten gleichermaßen gebildet wird. Eine Kooperation der B-Lymphozyten mit anderen Zellen war dabei nicht erforderlich. ARVILOMMI und RÄSÄNEN (1975)haben in ihrem System festgestellt, daß LIF nicht von T-Lymphozyten gebildet wird, sondern von B-Lymphozyten und/oder Monozyten. BENDTZEN und BENDIXEN (1980) vermuten, daß LIF von einer in nur geringer Zahl vorkommenden Lymphozytensubpopulation gebildet wird, die nicht von den übrigen Lymphozyten abgetrennt werden kann. NEVILLE und LISCHNER (1977) haben die Produktion von LIF nach Stimulation von K-Zellen mit Immunkomplexen beobachtet.

Fest steht jedoch, daß unabhängig davon, ob LIF nun von T- oder B-Lymphozyten oder einer anderen Lymphozytensubpopulation gebildet wird, in vitro von Lymphozyten nach Stimulation mit einem Antigen gebildetes LIF eng korreliert ist mit der Fähigkeit des Lymphozytendonors, in vivo im Intrakutantest auf das gleiche Antigen mit einer Reaktion vom Spättyp zu antworten. Der LIF-Test wird deshalb allgemein als ein in vitro Korrelat für die zelluläre Immunität angesehen (SOBORG u. BENDIXEN 1967, FEDERLIN et al. 1971, GAINES et al. 1972, CLAUSEN 1973b, ROCKLIN 1974, CHESS et al. 1975, HOFFMAN et al. 1976, BERGSTRAND 1979, BENDTZEN u. BENDIXEN 1980). Einen weiteren Hinweis auf die enge Verknüpfung der zellulären Immunität mit der Bildung von LIF geben die Untersuchungen von CARUSO und BELLINA (1983), die feststellten, daß die in vitro-Bildung von LIF bei Trägern

bestimmter HLA-Antigene vermindert ist und bei den Trägern dieser Antigene zugleich immunologisch bedingte Erkrankungen gehäuft auftreten, die mit einer verminderten zellulären Immunität verbunden sind.

2.2. Lymphozytenmediatoren und ihre Bedeutung unter besonderer Berücksichtigung der Migrationshemmung im Serum

Es bestehen viele Hinweise darauf, daß die in vitro von Lymphozyten, Monozyten und anderen Zellen gebildeten Mediatoren auch in vivo von den gleichen Zellen nach entsprechender Stimulierung gebildet werden und daß durch in vitro und in vivo gebildete Mediatoren in vivo zelluläre Reaktionen ausgelöst werden können (PICK 1976). YAMAMOTO und TAKAHASHI (1971) haben mit Serum desensibilisierter Meerschweinchen eine Migrationshemmung von normalen Meerschweinchenmakrophagen festgestellt. Mit diesen Seren konnten sie nach intrakutaner Injektion bei nicht sensibilisierten Meerschweinchen zelluläre Reaktionen vom verzögerten Typ auslösen. Die Migrationshemmungsaktivität fand sich nach biochemischer Auftrennung der Seren in der selben Fraktion wie MIF, das nach in vitro-Stimulierung von Lymphozyten gewonnen wurde.

YOSHIDA und COHEN (1974) haben bei Meerschweinchen vier Stunden nach intravenöser Injektion von konzentrierten, in vitro hergestellten Lymphozytenkulturüberständen mit MIF-Aktivität eine Reduktion der Monozytenzahlen im Blut um 60% beobachtet. 24 Stunden nach der Injektion hatten sich die Monozytenzahlen wieder normalisiert. Sechs und zwölf Stunden nach intravenöser Injektion von spezifischem Antigen in vorsensibilisierte Meerschweinchen wiesen die Untersucher MIF-Aktivität im Serum dieser Tiere nach. In einer früheren Arbeit hatten YOSHIDA et al. (1969) festgestellt, daß sechs Stunden nach intravenöser Injektion

von Antigen in spezifisch vorsensibilisierte Tiere die Zahl der zirkulierenden Monozyten stark reduziert war. Aufgrund der zeitlichen Zusammenhänge schlossen die Autoren, daß durch endogen produziertes MIF die Monozytenzahlen zeitlich begrenzt reduziert wurden. NELSON und BOYDEN (1963) haben nach intraperitonealer Injektion von MIF-haltigen Lymphozytenkulturüberständen eine Reduktion der Anzahl von Makrophagen im Peritonealexsudat beobachtet.

Die Ausschüttung von MIF oder MIF-ähnlichen Substanzen in die Zirkulation kann unter Einhaltung besonderer Bedingungen nach intravenöser Verabreichung von Antigen bei gegen dieses Antigen sensibilisierten Versuchstieren (YAMAMOTO u. TAKAHASHI 1971, RUSCETTI et al. 1976, NETA u. SALVIN 1981) und nach intravenöser Verabreichung von Tiloron an Mäuse induziert werden (FAHLBUSCH et al. 1981). Faktoren mit MIF- oder MIF-ähnlicher Aktivität im Serum wurden außerdem bei lymphoproliferativen Erkrankungen des Menschen (COCHRAN et al. 1973, COHEN et al. 1974), nach Lebertransplantationen am Menschen (TORISU et al. 1975), bei Ratten in der Gravidität und nach Hauttransplantation (GILL u. KUNZ 1980) und in fetalem Kälberserum gefunden (FOX et al. 1974). Auch in anderen Körperflüssigkeiten, wie der Lymphe von Schafen (HAY et al. 1973) oder Ascitesflüssigkeit von Mäusen mit Zajdela-Hepatom (FAHLBUSCH u.DORNBERGER 1979) wurde MIF-Aktivität nachgewiesen.

Wie in vitro kommt es auch in vivo zur MIF-Bildung, wenn ein Individuum durch wiederholten oder ständigen Kontakt gegen ein Antigen sensibilisiert wurde. Nach einer Stimulierung durch Histokompatibilitätsantigene, - in vivo nach Hauttransplantationen, in vitro in der MLC - wurden Lymphokine auch ohne vorausgehende Sensibilisierung gebildet. COCHRAN et al. (1976) haben unter Verwendung von homologen Leukozyten als Zielzellen migrationshemmende bzw. -stimulierende Aktivität im Serum von Krebskranken gefunden. BOTTO et al. (1977), FASSAS et al. (1979) und FASSAS und BRULEY-ROSSET (1979) fanden eine Hemmung oder Stimulierung der Wanderung homologer Leukozyten durch die Seren von Patienten mit verschiedenen Leukämieformen und Tumoren. Eine die Migration der Leukozyten beeinflussende Aktivität im Serum war nur nachweisbar, wenn die Patienten im DNCB-Hauttest (DNCB = Dinitrochlorbenzen),der als ein in vivo-Test für die Funktion des zellvermittelten Immunsystems angesehen wird, positiv reagierten. Bei gesunden Kontrollpersonen sowie bei Patienten, die in einem progressiven Stadium der Tumorkrankheit oder durch Chemotherapie immunsupprimiert waren, konnte weder eine Serum-Aktivität noch eine Reaktion im DNCB-Hauttest festgestellt werden. Bei Patienten, deren Serum die Migration von Leukozyten beeinflussende Aktivität enthielt, kam es nach Chemotherapie häufiger zu einer Tumorregression als bei Patienten ohne Serum-Aktivität. Es besteht eine Korrelation zwischen der die Migration von Leukozyten beeinflussenden Serum-Aktivität und gegen den Tumor gerichteten Antikörpern. Aufgrund dieser Beobachtungen schlossen die genannten Autoren, daß sowohl eine Stimulierung als auch eine Hemmung der Leukozytenmigration durch im Serum vorhandene Faktoren

eine immunologische Auseinandersetzung des Wirtes mit dem Tumor und einen Zustand der Immunkompetenz des Wirtes anzeigt. Die Interpretation negativer Resultate ist nur unter Hinzuziehung des DNCB-Hauttests möglich.

Dagegen kamen PETRINI et al. (1982) zu dem Schluß, daß die LIF-Aktivität, die im Serum von Patienten mit Morbus Hodgkin gefunden wurde, wahrscheinlich einen Status der zellulären Immunsuppression widerspiegelt, da bei LIF-positiven Patienten auch die in vitro-Stimulation der T-Lymphozyten mit Phytohämagglutinin unterdrückt war. Außerdem verminderten die LIF-positiven Seren auch die Fähigkeit gesunder Leukozyten, auf chemotaktische Reize zu reagieren und Hefepartikel zu phagozytieren. BERTOTTO et al. (1980, 1981) haben in 78,5% der untersuchten Fälle bei Kindern mit infektiöser Mononukleose und in 68% der Fälle von Patienten mit RSV-Bronchiolitis im Serum Aktivität mit hemmender Wirkung auf die Migration homologer Leukozyten gefunden. Sie sind der Meinung, daß Serum-LIF ein in vitro-Korrelat der zellvermittelten Immunität darstellt. Im Fall der infektiösen Mononukleose vertreten sie die Auffassung, daß LIF in vivo von einer Subpopulation von Suppressorlymphozyten gebildet wird und möglicherweise für die Suppression einiger bei dieser Krankheit in vivo und in vitro untersuchter zellulärer Reaktionen verantwortlich ist.

2.3. Zelluläre Immunreaktionen bei der Trypanosomiasis und Trypanotoleranz

Die afrikanische Trypanosomiasis ist eine Erkrankung mit metazoischen Parasiten, die im Blut oder Gewebe von Mensch und Tier parasitieren und zyklisch durch Tsetsefliegen oder mechanisch durch andere blutsaugende Insekten übertragen werden. Die für das Rind pathogenen Trypanosomenspezies sind T.congolense, T.vivax und T.brucei. Bestimmte in mit Trypanosomen durchseuchten Gebieten heimische Rinderrassen, wie N'Dama- oder Dahomey-Rinder besitzen die Eigenschaft einer Trypanotoleranz. Sie ist gekennzeichnet durch die Fähigkeit der trypanotoleranten Rassen, die Höhe der Parasitämie zu begrenzen sowie durch eine abgeschwächte klinische Symptomatik und eine geringere Mortalität. Der Ausdruck Trypanotoleranz ist im immunologischen Sinn irreführend, da trypanotolerante Rassen gegenüber einer Infektion mit Trypanosomen empfänglich bleiben und auf die Infektion auch mit der Bildung spezifischer Antikörper reagieren. Sie sollte deshalb besser als verminderte Empfänglichkeit oder erhöhte Resistenz gegenüber Trypanosomen bezeichnet werden. Es gilt als erwiesen, daß die Trypanotoleranz genetisch verankert ist. (MURRAY et al. 1982).

Die Mechanismen, die zu einer verbesserten Resistenz gegenüber Trypanosomen führen, sind im einzelnen unbekannt. Eine Reihe von Hinweisen deuten darauf hin, daß es sich um ein immunologisch bedingtes Phänomen handelt (MURRAY et al. 1979, 1982).

So ist die Empfänglichkeit für T.congolense bei Nacktmäusen ohne Thymus und bei splenektomierten Mäusen gegenüber normalen Mäusen stark erhöht. HÖRCHNER (1983) definiert die Trypanotoleranz als eine labile, in einem eng umschriebenen Gebiet mit bestimmten Serotypen von Trypanosomen erworbene Immunität. Er hält die Fähigkeit, eine Trypanotoleranz auszubilden, mehr für ein individuelles als für ein rassespezifisches Merkmal. Nur die Frequenz, mit der diese Eigenschaft auftritt, ist in den sogenannten trypanotoleranten Rassen wesentlich höher als in den trypanosensiblen Rassen. Auch MURRAY et al. (1979) weisen darauf hin, daß die Trypanotoleranz mehr quantitativer als qualitativer Natur ist und einen sehr labilen Zustand erhöhter Resistenz gegenüber Trypanosomen darstellt. Der Grad der Trypanotoleranz ist abhängig von der Virulenz der Trypanosomen, dem Infektionsdruck, dem Ernährungszustand und dem Alter der Rinder. Die Trypanotoleranz kann durch Streßeinflüsse, durch erhöhten Infektionsdruck oder durch Verbringen von trypanotoleranten Tieren in andere, mit Trypanosomen durchseuchte Gebiete durchbrochen werden.

TERRY (1976) sprach die Vermutung aus, daß die genetisch und die immunologisch bedingte Trypanotoleranz möglicherweise eine gemeinsame Grundlage haben, wenn man die Existenz von Ir-Genen und V-Genen mit in Betracht zieht. Ir-Gene (Immune response-Gene) determinieren die Immunantwort auf ein bestimmtes Antigen und V-Gene das variable Ende von zirkulierenden Antikörpern und zellgebundenen Rezeptor-Antigenen. Die Ir-Gene weisen eine enge Koppelung mit Genen des Histokompatibilitätskomplexes der Tiere

auf. Die Vermutung von Terry konnte allerdings im Mäusemodell an ingezüchteten, im H-2-Locus, dem Histokompatibilitätskomplex der Maus, identischen und unterschiedlich für Trypanosomen empfänglichen Mäusestämmen noch nicht bestätigt werden. MORRISON et al. (1978) haben in Untersuchungen mit T.congolense, LEVINE u. MANSFIELD (1981) mit T.rhodesiense, GEE (1982) mit T.vivax, WRIGHTSMAN et al. (1982) und TRISCHMANN u. BLOOM (1982) mit T.cruzi keinen oder nur einen untergeordneten Einfluß des H-2-Locus auf den Infektions- bzw. Krankheitsverlauf feststellen können.

Die bisher vorliegenden Untersuchungen zur Immunologie der Trypanosomiasis beziehen sich vorwiegend auf das humorale Immunsystem. In diesen Untersuchungen wurde festgestellt, daß durch Infektionen mit Trypanosomen eine Immunsuppression gegenüber trypanosomalen sowie bakteriellen und viralen Antigenen verursacht wird. (HOLMES et al. 1974, RURANGIRWA et al. 1980). Durch die Wirkung trypanosomaler Mitogene kommt es außerdem zu einer polyklonalen B-Lymphozyten-Aktivierung, und damit verbunden zum Auftreten hoher Titer unspezifischer IgM-Moleküle, sowie zum Auftreten heterophiler Antikörper und Autoimmunantikörper. Im Zusammenhang mit der polyklonalen Lymphozytenaktivierung durch trypanosomale Mitogene wird eine Erschöpfung des Immunsystems während einer Trypanosomeninfektion diskutiert (MURRAY et al. 1974). Serologische Untersuchungen haben auch ergeben, daß die Trypanosomen durch raschen Wechsel ihrer Oberflächenantigene (VSSAs = Variant Specific Surface Antigens), gegen die allein

protektive Antikörper gebildet werden, sich einer effektiven Abwehr durch den Wirt entziehen.

Über die Funktion des zellulären Immunsystems im Verlauf von Trypanosomeninfektionen gibt es noch relativ wenige Untersuchungen. Die meisten dieser Untersuchungen wurden bei Laboratoriumstieren, und hier besonders bei Mäusen, vorgenommen, weil die Untersuchungen in definierten Inzuchtlinien wesentlich einfacher durchzuführen und zu beurteilen sind, als beispielweise am Rind. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß die Funktion der T-Lymphozyten, wie die der B-Lymphozyten, während einer Trypanosomeninfektion im allgemeinen gestört ist (Tab. 1a - d). Die Immunsuppression wird teilweise von T-Suppressorzellen und suppressiven Makrophagen hervorgerufen. Es müssen jedoch noch weitere suppressive Einflüsse, wahrscheinlich der Trypanosomen selbst, vorhanden sein (CORSINI et al. 1977, PEARSON et al. 1979). Nur in wenigen Testsystemen war die Funktion der T-Lymphozyten von infizierten Individuen der von nicht infizierten vergleichbar. Dies bezieht sich auf die in vitro-Bildung von Blastogenem Faktor bei mit T.congolense infizierten Kaninchen und die Ausbildung einer Hautreaktion gegenüber DNFB (DNFB = Dinitrofluorbenzen) bei mit T.brucei infizierten Mäusen. MANSFIELD u. WALLACE (1974) vermuten deshalb, daß die Funktion bestimmter T-Lymphozytensubpopulationen durch Trypanosomen nicht immunsuppressiv beeinflußt wird.

Es ist wenig darüber bekannt, in welcher Weise das zelluläre Immunsystem eine Infektion mit Trypanosomen beeinflußt. MORRISON et al. (1978) haben bei ingezüchteten Mäusestämmen, die eine unterschiedliche Empfänglichkeit gegenüber T.congolense aufwiesen, festgestellt, daß in weniger empfänglichen Stämmen die beobachteten Veränderungen in der Milz weniger ausgeprägt waren als bei hochempfänglichen Stämmen. Eine geringfügige Zunahme der T-Zellen der Milz in den hochempfänglichen Inzuchtlinien wird als eine mögliche starke Vermehrung einer T-Suppressorzellensubpopulation interpretiert. Die Empfänglichkeit für Trypanosomeninfektionen bei Nacktmäusen mit angeborener Thymusaplasie ist stark erhöht (MORRISON et al. 1978). Eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber Trypanosomen ist auch bei splenektomierten Mäusen gegeben, doch ist sie weniger ausgeprägt als bei Mäusen mit angeborener Thymusaplasie. Während einer Trypanosomeninfektion tritt die Immunsuppression im zellulären Immunsystem deutlich später auf als im humoralen System. Bei mit inaktiviertem Aujeszky-Virus immunisierten Schweinen wurde beobachtet, daß das zelluläre Immunsystem zu einem sehr viel früheren Zeitpunkt auf ein in den Organismus eingeführtes Antigen reagiert als das humorale Immunsystem (GUTEKUNST 1979). Allergische Reaktionen vom Spättyp treten ebenfalls bereits wenige Tage nach der Sensibilisierung eines Organismus gegen ein Antigen auf,während Allergien vom Soforttyp erst nach der Bildung von spezifischen Antikörpern 8 - 10 Tage nach der Sensibilisierung beobachtet werden können (ROLLE u.MAYR 1978).

Tabelle 1a: Zelluläre Immunreaktionen nach experimenteller Infektion mit Trypanosomen.

	A	B	C	D	E	F
Proliferation in T-abhängigen Bezirken von Lymphknoten und Milz		c-	b- e-			5 6 9
Zunahme der T-Zellen in der Milz			b+(vorüber-gehend) c(±)			11,12 13,16
Blastentransformation von T-Zellen der Milz			b+ c+			8 11

Tabelle 1b: Funktionsprüfungen des zellulären Immunsystems bei der Trypanosomiasis nach Belastung mit trypanosomalen Antigenen in vitro und in vivo.

	A	B	C	D	E	F
Lymphoblastentransformation nach Stimulierung mit Trypanosomenextraktantigen	r+ g+					10 17
Lymphoblastentransformation nach Stimulierung mit lysierten Trypanosomen		b- c-	b- c-	b- c-	b- c-	7
MIF-Bildung		c-				3
SRF-Bildung		c-				3
Hautreaktion vom Spättyp		b± c-				2 3

Zeichenerklärung: A = Mensch; B = Kaninchen; C = Maus; D = Meerschweinchen; E = Ratte; F = Quellenangabe; b = Infektion mit T.brucei; c = Infektion mit T.congolense; e = Infektion mit T.equiperdum; g = Infektion mit T.gambiense; r = Infektion mit T.rhodesiense; + = infizierte und nicht infizierte Individuen reagierten gleich; - = Reaktion war bei infizierten Individuen gegenüber nicht infizierten vermindert oder ganz aufgehoben.

Tabelle 1c: In vitro-Funktionsprüfungen des zellulären Immunsystems bei der Trypanosomiasis.

	A	B	C	D	E	F
Lymphoblastentransformation nach Stimulierung mit PHA, ConA, an der Infektion nicht beteiligten Antigenen oder in der MLC			c-	b- c- e-		5,8, 9,13, 14,15 16
Bildung cytotoxischer Lymphozyten in der MLC				c-		13 16
MIF-Bildung nach Stimulierung mit an der Infektion nicht beteiligtem Antigen			c-			5
Bildung von BF nach Stimulierung mit an der Infektion nicht beteiligtem Antigen			c+			5

Tabelle 1d: In vivo-Funktionsprüfungen des zellulären Immunsystems bei der Trypanosomiasis.

	A	B	C	D	E	F
Hautreaktion vom Spättyp auf ein an der Infektion nicht beteiligtes Antigen	g-	c-				4 5
Hautreaktion auf DNCB	g-					4
Hautreaktion auf DNFB			b+			14
Abstoßung von Hauttransplantaten			c-			13
Uridin-Einbau in Lymphknoten nach Stimulierung mit Oxazolon			b+(bis 3Wo) b-(ab 5Wo.)			6
Entwicklung einer experimentellen allergischen Neuritis		b-				1
T-Helferzellen-Funktion			b-			14

Erklärung der Abkürzungen: BF = Blastogener Faktor; ConA = ConcanavalinA; DNCB = Dinitrochlorbenzen; DNFB = Dinitrofluorbenzen; MLC = Mixed Lymphocyte Culture; PHA = Phytohämagglutinin; SRF = Skin Reactive Factor.

Quellenangaben zu den Tabellen 1a - d:

1. ALLT et al. (1971),
2. TIZARD u. SOLTYS (1971),
3. MANSFIELD u. KREIER (1972),
4. GREENWOOD et al. (1973),
5. MANSFIELD u.WALLACE (1974)
6. MURRAY et al. (1974),
7. MANSFIELD et al. (1976),
8. CORSINI et al. (1977),
9. MOULTON u. COLEMAN (1977),
10. GREENWOOD u. ODULOJU (1978),
11. MAYOR-WITHEY et al. (1978),
12. MORRISON et al. (1978),
13. PEARSON et al. (1978),
14. ASKONAS et al. (1979),
15. PEARSON et al. (1979),
16. ROELANTS et al. (1979),
17. SELKIRK et al. (1981).

Die entscheidenden Abwehrmechanismen gegen eine Infektion mit Trypanosomen sind daher möglicherweise im zellulären Immunsystem zu suchen.

Die bei den Laboratoriumstieren gewonnenen Ergebnisse dürfen jedoch nicht ohne weiteres auf das Rind übertragen werden, weil das Immunsystem des Rindes offenbar nicht so einschneidend durch eine Trypanosomeninfektion betroffen wird, wie das der Maus (MURRAY et al. 1982). SOLLOD u. FRANK (1979) konnten bei akut mit T.congolense infizierten Rindern (F 1 - Kreuzungen aus Boran-Rindern x Simmentaler) eine Suppression der Lymphoblastentransformation nach Stimulierung mit Phytohämagglutinin und Pokeweed-Mitogen oder in der gemischten Lymphozytenkultur nicht feststellen. Die Autoren weisen allerdings darauf hin, daß es möglicherweise während einer chronischen Verlaufsform der Trypanosomiasis, wie sie beim Rind unter natürlichen Bedingungen sehr häufig ist, zu einer Immundepression kommt. Bei mit T.vivax infizierten Boran-Rindern haben MASAKE u. MORRISON (1981) ebenfalls keine Suppression der Thymidineinbaurate von Lymphozyten aus peripherem Blut, Lymphknoten oder Milz nach mitogener Stimulation mit Pokeweed-Mitogen, Phytohämagglutinin oder Lipopolysaccharid festgestellt. Weder Lymphozyten von infizierten noch von nicht infizierten Tieren reagierten auf eine Stimulation mit T.vivax-Antigen. Trotz intensiver zellulärer Proliferation in den thymusabhängigen Bezirken von Lymphknoten und Milz blieb der strukturelle Aufbau der Organe erhalten. Die Anzahl

proliferierender T-Zellen konnte von den Untersuchern nicht bestimmt werden, da in diesen Bezirken viele Plasmazellen vorhanden waren. Nach MASAKE u. MORRISON (1981) wird der Immunsuppression bei der Rindertrypanosomiasis eine zu große Bedeutung beigemessen.

MASAKE et al. (1981) haben nach Stimulierung von Blutlymphozyten mit Pokeweed-Mitogen und Concanavalin A bei mit T.congolense infizierten Boran-Rindern eine gegenüber nicht infizierten Rindern verminderte Lymphoblastentransformation festgestellt. Bei infizierten Rindern war ohne Mitogenstimulation die Lymphoblastentransformation gegenüber Lymphozyten nicht infizierter Rinder erhöht. Die Untersucher nehmen an, daß durch trypanosomales Mitogen oder Antigen bereits stimulierte Lymphozytenklone einer Stimulierung durch Pokeweed-Mitogen bzw. Concanavalin A nicht mehr zugänglich sind. Die Funktionsfähigkeit der verbleibenden, durch Mitogen bzw. Antigen von Trypanosomen noch nicht stimulierten Lymphozyten bleibt dabei erhalten.

EMERY et al. (1980) haben beobachtet, daß die Blutlymphozyten von Boran-Rindern auf eine Stimulation mit T.congolense-Antigen mit einer Lymphoblastentransformation reagierten, wenn die Rinder vorher mit T.congolense infiziert und mit Berenil ^{R} behandelt oder lediglich mit abgetöteten Trypanosomen immunisiert waren. Lymphozyten von Rindern mit einer manifesten Trypanosomeninfektion waren dazu jedoch nicht in der Lage.

RURANGIRWA et al. (1980) haben den Einfluß der Seren von mit T.congolense infizierten Boran-Rindern auf die Lymphozytentransformation in vitro sowie auf die Migration von Granulozyten untersucht, Während die Seren infizierter Rinder auf die Lymphoblastentransformation keinen Einfluß hatten, wurden autologe sowie homologe Granulozyten durch Seren gehemmt, die an den Tagen 15, 20 und 25 nach der Trypanosomeninfektion gewonnen wurden. Die Autoren vermuten, daß die Hemmaktivität der von ihnen gewonnenen Seren teilweise für die bei kleinen Laboratoriumstieren beobachtete Suppression des zellulären Immunsystems verantwortlich sein könne.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Methodik

3.1.1. Versuchstiere

Im Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Universität München wurden an 20 Rindern, verteilt auf drei Versuchsreihen, Infektionsversuche mit Trypanosomen verschiedener Spezies durchgeführt (GEISSELBRECHT 1983, HEINRICH 1983). Im einzelnen handelte es sich um vier Deutsche Schwarzbunte Rinder, zehn Dahomey-Rinder, drei Rinder des Deutschen Fleckvieh und drei F1-Kreuzungstiere aus N'Dama x Deutsches Fleckvieh. Von diesen 20 Rindern wurden die Seren für die Untersuchung der Migrationshemmaktivität zur Verfügung gestellt. In Tabelle 2 sind die Rinder der einzelnen Versuchsreihen nach Rasse, Alter und Geschlecht zusammengestellt. Außerdem sind aus der Tabelle 2 die Bezeichnung der Tiere sowie die Trypanosomenspezies, mit der sie infiziert wurden, zu entnehmen. GEISSELBRECHT (1983) und HEINRICH (1984) haben in ihren Arbeiten zum parasitologischen und klinischen Verlauf der Trypanosomeninfektion zwei verschiedene Dahomey-Rinder jeweils mit D4 bezeichnet. Um Verwechslungen vorzubeugen, wurde in der vorliegenden Arbeit das nicht infizierte Kontrollrind D4 aus der ersten Versuchsreihe mit dem Zusatz "(1.Versuchsreihe)" und das mit T.

Tabelle 2

1. Versuchsreihe									2. Versuchsreihe					
Rasse	Schwarzbunte				Dahomey				Fleckvieh			N'Dama x Fleckvieh Kreuzungen		
Bezeichnung	S1	S2	S3	S4	D1	D2	D3	D4	F1	F2	F3	K1	K2	K3
Alter	2	2	1/2	1/2	4	4	6	3	1/2	1/2	1/2	2	2	2
Geschlecht	♂k	♀	♂	♂	♂	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂k	♂k	♀
infiziert mit	C1	C1	C1	K	C1	C1	C1	K	C1	C1	K	C1	C1	K

3. Versuchsreihe						
Rasse	Dahomey					
Bezeichnung	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Alter	6	4	2 1/2	10	6	4
Geschlecht	♀	♀	♀	♀	♀	♂
infiziert mit	C2	C2	C2	B	B	K

Erklärung der Abkürzungen

ok = kastrierte maännliche Tiere
B = Trypanosoma brucei Stamm Hamburg
C1 = Trypanosoma congolense Stamm UHAYA-EATRO 291
C2 = Trypanosoma congolense Stamm 423 Clon O
K = nicht infizierte Kontrollrinder

congolense infizierte Rind D4 aus der dritten Versuchsreihe mit dem Zusatz "(3.Versuchsreihe)" versehen.

Die Rinder S1 und S2 sowie D1 und D2 waren bereits früher mit Trypanosoma congolense infiziert, wurden aber sechs Monate vor Versuchsbeginn mit Berenil^{R} behandelt und waren danach parasitologisch, nicht jedoch serologisch negativ. Bei den übrigen Rindern handelte es sich um Erstinfektionen mit Trypanosomen. Die Rinder S4, D4 (1.Versuchsreihe), F3, K3 und D9 dienten als nicht infizierte Kontrolltiere. Infiziert wurde jeweils subkutan in der ersten Versuchsreihe mit $1{,}5 \times 10^6$, in der zweiten Versuchsreihe mit $2{,}0 \times 10^6$ T.congolense (Stamm UHAYA-EATRO 291), in der dritten Versuchsreihe mit jeweils $2{,}0 \times 10^5$ klonierten T. congolense (Stamm 423 Klon 0) bzw. T.brucei (Stamm Hamburg).

3.1.2. Serumproben zur Untersuchung auf ihre Hemmungsaktivität im Migrationstest

Die Blutproben von den Versuchsrindern wurden jeweils morgens um die selbe Zeit mit dem Venojekt^{R}-System aus der Jugularvene entnommen und anschließend zur Serumgewinnung zentrifugiert. Die gewonnenen Serumproben wurden bei $-20^{o}C$ in Plastik-Reaktionsgefäßen in 1-ml-Portionen eingefroren und bis zur Bearbeitung aufbewahrt.

Von allen im Versuch stehenden Tieren wurden vor der Infektion Serumproben entnommen, die später als Kontrollproben dienten. Am Tag der Infektion (Tag 0) wurden von allen Versuchstieren Serumproben vier und acht Stunden nach der Infektion gewonnen. An den beiden auf die Infektion folgenden Tagen erfolgte die Blutentnahme zur Serumgewinnung jeweils morgens und abends. Bei den Rindern der ersten Versuchsreihe erfolgte die Serumgewinnung vom dritten bis zum elften Tag einmal täglich, später zunächst zweimal wöchentlich und ab dem 43. bis zum 85.Tag einmal in der Woche. Von den Tieren der zweiten und dritten Versuchsreihe wurden die Serumproben vom dritten bis zum 30.Tag nach der Infektion täglich einmal gewonnen.

3.1.3. Zielzellen für den Migrationstest

Schweinegranulozyten dienten als Zielzellen zur Prüfung der Hemmaktivität der gewonnenen Rinderseren. Für jeden Hemmungstest wurden jeweils Granulozyten von zwanzig Schweinen gepoolt.

Die Granulozytengewinnung erfolgte aus jeweils 10 ml stabilisiertem,bei der Schlachtung entnommenem Blut. Der in einem Verhältnis von 1:5 eingesetzte Stabilisator hatte folgende Zusammensetzung:

Natriumchlorid	2,5 g
Natriumcitrat	30,0 g
Natriumcyanid	0,2 g
Streptomycin	0,5 g
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

Durch Einsatz von silikonisierten Plastikröhrchen (Silikonlösung, Serva) und Verwendung einer Kühlzentrifuge bei der Isolierung der Granulozyten kann eine Oberflächenhaftung dieser Zellen weitgehend vermieden und die Zellausbeute erhöht werden.

Bei der Granulozytenisolierung wurde zur Beschleunigung der Erythrozytensedimentation dem Blut 5%iges Dextran zugesetzt. Das in physiologischem NaCl gelöste Dextran (Dextran T250, Pharmacia Fine Chemicals, MG 250 000) wurde im Verhältnis 1:4 dem stabilisierten Blut zugegeben und das Gemisch 60 min bei 37°C bebrütet. Nach dieser Zeit reichern sich die Leukozyten über dem Erythrozytensediment an und lassen sich mit einer Pasteurpipette abziehen. In einem weiteren Arbeitsgang wurden die so gewonnenen Leukozyten vorsichtig auf den Dichtegradienten Uromiro (spez. Gew. 1,119 / Dr.Franz Köhler Chemie, Alsbach) überschichtet und anschließend bei 500 g 20 min in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befinden sich die so isolierten Granulozyten im Sediment. Alle anderen Blutzellen befinden sich im Überstand und können mit der Wasserstrahl-Pumpe abgesaugt und verworfen werden. Zur Entfernung noch in der Granulozytenfraktion verbliebener Erythrozyten wurde das Sediment

mit 10 ml o,85%iger Ammoniumchloridlösung hämolysiert und die Granulozyten mit 150 g 10 min in der Kühlzentrifuge zurückgewonnen. Anschließend wurden die Granulozyten zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Nach dem ersten Waschvorgang wurden die Granulozytenpräparationen der zwanzig Schweine gepoolt.

Die mit diesem Verfahren isolierte Zellfraktion bestand zu über 98% aus segmentkernigen Granulozyten. Der Rest waren Lymphozyten. Die Granulozytenfraktion war völlig frei von Erythrozyten und Thrombozyten. Die im Farbausschlußtest ermittelte Vitalität der Granulozyten betrug 99 - 100%. Mit der verwendeten Methode konnten durchschnittlich 66% der im Nativblut vorhandenen Granulozyten gewonnen werden.

Nach dem letzten Waschvorgang wurde besonders darauf geachtet, daß die physiologische Kochsalzlösung vollständig abgesaugt wurde, um Verdünnungsfehler bei der anschließenden Zählung der Zellen zu vermeiden. Zur Granulozytenzählung wurden die Zellen in 4 ml physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und unter Verwendung einer Erythrozytenzählpipette 1:200 verdünnt. Die Zellzählung erfolgte in der Neubauer-Zählkammer unter Berücksichtigung der 4 x 16 großen Eckquadrate.

Für den Migrationstest wurde die Zellzahl auf 250 000/ µl Agarose-Medium nach folgender Formel eingestellt:

$$V_x = \frac{Z \times V}{Z_b}$$

V_x = erforderliches Volumen in ml

Z = vorhandene Zellzahl pro µl

V = vorhandenes Volumen in ml

Z_b = beabsichtigte Zellzahl pro µl

3.1.4. Der Migrationshemmungstest

3.1.4.1. Technik

Zum Nachweis der Migrationshemmungsaktivität im Serum wurde das Agarose-Droplet-Verfahren von HARRINGTON u. STASTNY (1973) modifiziert. Als Vorbereitung wurden Agaroselösungen und Zellkulturmedien in verschiedenen Konzentrationen hergestellt, portioniert und eingefroren.

0,4%ige und 0,8%ige Agaroselösung (Fluka, Schweiz) in Aqua dest. wurde bei Siedetemperaturen hergestellt und in Portionen zu 3 bzw. 2 ml bei-20°C tiefgefroren. Agarose wurde gewählt, weil sie den Vorteil hat, daß sie bei den erforderlichen Konzentrationen von 0,2 bis 0,4% bei 37°C flüssig bleibt und die Zellen im physiologischen Temperaturbereich darin suspendiert werden können.

Aus RPMI 1640 Pulvermedium (Serva, Heidelberg) ohne Natriumbikarbonat mit Glutamin wurde zehnfach konzentriertes Flüssigmedium als Stammlösung hergestellt und eingefroren. Aus dieser Stammlösung wurde einfach und zweifach konzentriertes Medium durch Verdünnen mit Aqua dest. hergestellt.

Sechs Teilen zweifach konzentriertem Medium wurden vier Teile unverdünntes Kaninchenserum zugegeben. Das Kaninchenserum wurde zuvor 30 min bei 56°C inaktiviert. Das zweifach konzentrierte Medium wurde danach mit 50 mMol HEPES (Serva, Heidelberg) gepuffert, mit 200 µg Streptomycin (Streptothenat R, Gruenenthal, Stolberg) pro ml versetzt und mit 5n Natronlauge auf pH 7,3 eingestellt. Das so hergestellte doppelt konzentrierte Medium wurde in Portionen von 2 ml bei -20°C tiefgefroren.

Im Gegensatz zu zweifach konzentriertem Medium wurde einfach konzentriertem RPMI 1640-Medium nur 31,25 mMol HEPES und 125 µg Streptomycin/ml, jedoch in der Vorbereitung kein Serum zugesetzt. Der pH-Wert wurde auf 7,25 eingestellt und Portionen von 45 ml wiederum tiefgefroren. Als Serumzusatz für dieses Medium diente das im späteren Testverlauf zugegebene Rinderserum, das auf seine Migrationshemmungsaktivität untersucht werden sollte.

Bei Bedarf wurden die Kulturmedien bei 37°C, die Agaroselösungen im siedenden Wasserbad aufgetaut. Agarose-Medium zur Suspension der Zielzellen wurde durch Vermischen von

gleichen Teilen 0,4%iger Agarose und zweifach konzentriertem Medium hergestellt. Das Agarose-Medium bestand damit aus 0,2% Agarose, einfach konzentriertem Medium, 20% Kaninchenserum, 25 mMol HEPES und 100µg Streptomycin/ml.

Der Migrationstest wurde in Gewebekultur-Multischalen (Nunc, mit 4 x 6 Schalen pro Platte) durchgeführt. Die Schalen hatten einen flachen Boden und einen Durchmesser von 15,5 mm. Zunächst wurden in die Mitte jeder Schale 5µl der im Wasserbad erhitzten 0,8%igen Agaroselösung mit Hilfe einer Mikroliter-Pipettierspritze (Hamilton 702 N, Bonaduz, Schweiz) mit einem auswechselbaren Teflonschlauchstück einpipettiert. Die Agarosetropfen wurden danach zwei Stunden bei 37°C getrocknet. Eine gute Haftung der später einpipettierten Zellsuspension auf dem Schalenboden war dadurch gewährleistet. Diese Trocknungsvorschrift ist unbedingt einzuhalten, da bei zu starker Austrocknung die Haftung ungenügend wird.

Unmittelbar vor dem Einpipettieren der Zellsuspension wurden die gepoolten Granulozyten in Kochsalzsuspension nochmals 5 min bei 150 g zentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Die Zielzellen wurden nun in einer Konzentration von 250 000/µl bei 37°C in dem vorbereiteten Agarose-Medium resuspendiert und im Wasserbad auf dieser Temperatur gehalten. Je 4 µl dieser Zellsuspension, entsprechend $1x10^6$ Zellen pro Tropfen, wurden mit der Mikroliterspritze auf dunklem Untergrund und bei guter Beleuch-

tung auf die vorgetrockneten Agarosetropfen aufgesetzt. Wenn die Platten dabei ebenfalls auf einer Temparatur von 37°C gehalten wurden, verteilte sich die Zellsuspension gleichmäßig bis an den Rand der vorgeformten Agarosetropfen, was eine gleichmäßige Auswanderung der Zellen nach allen Richtungen ermöglichte. Anschließend wurden die Tropfen 5 min bei 4°C geliert und dann sofort mit 400 µl einfach konzentriertem Medium vorsichtig bedeckt, um ein Austrocknen der Zellsuspension zu vermeiden. Zu diesem Medium wurde pro Schale 100 µl Test- bzw. Kontrollserum, entsprechend 20% Serum im Medium, hinzugefügt und der Test bei 37°C inkubiert.

Nach 18 Stunden wurde die Wanderung der Granulozyten unterbrochen, indem die Platten 5 min bei 4°C gekühlt wurden (GLASSER u. FIEDERLEIN 1979). Die Zeit von 5 min muß unbedingt beachtet werden, da sich die Zellen sonst vom Schalenboden ablösen und bei geringen Bewegungen der Platte abgeschwemmt werden können. Anschließend wurden die Migrationshöfe unter dem Mikroskop gemessen.

3.1.4.2. Auswertung

Die Größe des Tests wurde so gewählt, daß die Migration der Zellen in einer Zeit von vier Stunden abgelesen werden konnte. In jedem Testansatz wurden in vier Platten mit insgesamt 96 Schalen 22 auf ihre Migrationshemmungsaktivität zu prüfende Rinderseren eines Tieres in vierfacher und

das entsprechende Kontrollserum des selben Tieres in achtfacher Ausführung untersucht.

Die Auswertung der Migrationshöfe erfolgte mit einem Phasenkontrastmikroskop (Wild M 40, Heerbrugg) bei 30-facher Vergrößerung unter Zuhilfenahme einer Okular-Mikrometer-Strichplatte. Die Messungen erfolgten in Strichplatteneinheiten. Gemessen wurde in Anlehnung an das Verfahren von JOKIPII und JOKIPII (1974) die Strecke vom Rand des Agarosetropfens bis zu der Stelle des Migrationshofes, an der die Zelldichte erkennbar abnahm und somit eine Grenze zu erkennen war. Verstreut liegende Zellen außerhalb dieser Grenze wurden nicht berücksichtigt. Die Abbildungen 1a - c zeigen Beispiele für einen ungehemmten, einen teilweise und einen total gehemmten Migrationshof.

Der Migrationsindex wurde aus den Durchschnittswerten nach folgender Formel berechnet:

$$MI = \frac{\text{durchschnittliche Migration der Zellen im Testserum}}{\text{durchschnittliche Migration der Zellen im Kontrollserum}} \times 100(\%$$

Werte unter 80% wurden als echte Hemmungen, Werte über 120% als echte Stimulationen der Migration angesehen. Jeder von einem Agarosetropfen ausgehende Migrationshof wurde in vier Richtungen entlang zweier aufeinander senkrecht stehender Linien vermessen. Damit wurde der Durchschnittswert bei jedem Testserum aus 16, bei jedem Kontrollserum aus 32 Messungen ermittelt.

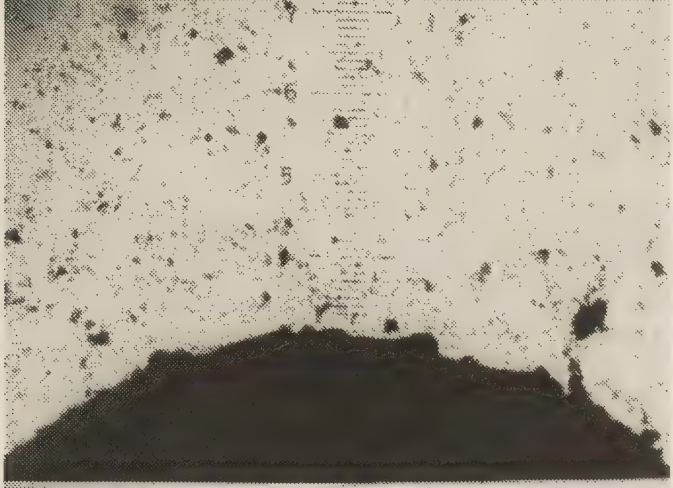


Abbildung 1a

Ungehemmte Migration

Abbildung 1b

Teilweise gehemmte Migration

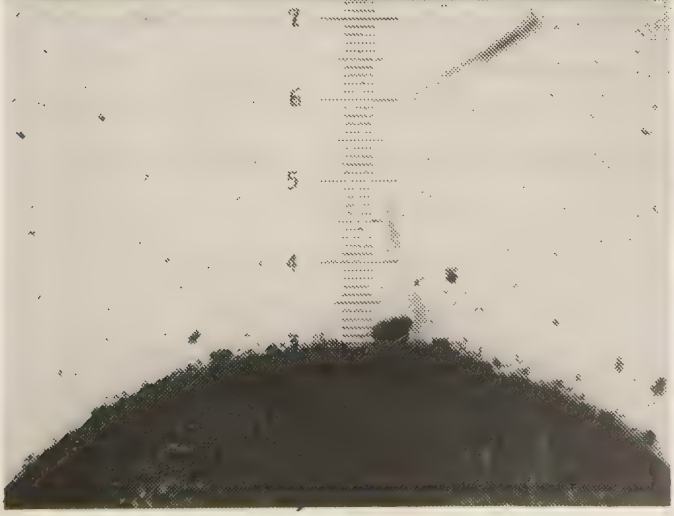


Abbildung 1c

Total gehemmte Migration

4. Ergebnisse

Die Migrationshemmungsaktivität von Rinderseren nach Trypanosomeninfektion unter Berücksichtigung von Parasitämie und Klinik.

Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen war die Bestimmung der Migrationshemmung von Granulozyten durch Seren von mit Trypanosomen infizierten Rindern unter Einbeziehung des Differentialblutbildes bei diesen Rindern. Befunde zum klinischen Verlauf der Trypanosomeninfektion wurden soweit erforderlich aus den Arbeiten von GEISSELBRECHT (1983) und HEINRICH (1984) berücksichtigt.

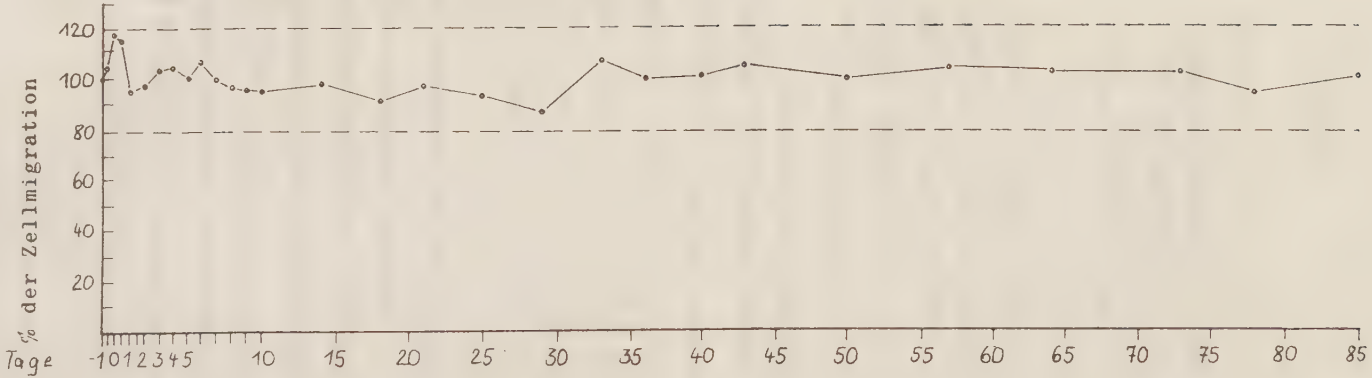
Die Untersuchungen wurden in drei Versuchsreihen durchgeführt. Die Versuchsreihen unterschieden sich in der Zusammensetzung aus verschiedenen Rinderrassen, im Beobachtungszeitraum, der Infektionsdosis und der Trypanosomenspezies, mit der infiziert wurde. Elf Rinder wurden erstmals mit Trypanosomen infiziert. Bei vier Rindern handelt es sich um Reinfektionen. Die Ergebnisse werden deshalb innerhalb der Versuchsreihen gesondert dargestellt.

4.1. Erste Versuchsreihe

Die erste Versuchsreihe bestand aus vier Rindern der Rasse Deutsche Schwarzbunte (S1 - S4) und vier Dahomey-Rindern (D1 - D4 (1.Versuchsreihe)). Bei den Rindern S3 und D3 handelte es sich um Tiere, die erstmals infiziert wurden. Die Rinder S1, S2, D1 und D2 waren bereits früher mit Trypanosomen infiziert, wurden dann sechs Monate vor Beginn dieses Versuchs mit Berenil^{R} behandelt und nun zum zweiten Mal infiziert. Die Rinder S4 und D4 (1.Versuchsreihe) dienten als nicht infizierte Kontrolltiere. Alle Rinder außer den Kontrolltieren erhielten $1,5 \times 10^{6}$ bewegliche und infektionsfähige Trypanosomen (T.congolense) subkutan injiziert. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich vom Tag vor der Infektion bis zum 85.Tag nach der Infektion. Serumproben wurden am Tag der Infektion und am Tag danach zweimal täglich, bis zum zehnten Tag nach der Infektion einmal täglich und später in größeren Abständen gewonnen. Als Kontrolle diente die Serumprobe, die am Tag vor der Infektion entnommen wurde.

Der Kurvenverlauf der Granulozyenmigration für die beiden Kontrolltiere D4 und S4 (Abb. 2 u. 3) zeigt eindeutig, daß sich die Hemmungsaktivität innerhalb des gewählten Vertrauensbereiches ohne größere Schwankungen bewegt. Das Kontrolltier S 4, ein im Alter von sechs Monaten neu zugekauftes Rind, erkrankte zu Beginn des Infektionsversuches an einer Bronchopneumonie. Die aus dem Kurvenverlauf ersichtliche Hemmung der Granulozytenwanderung am Tag 2 wird auf diese Infektion zurückgeführt.

Abb.2: Migrationskurve des Kontrollrindes D4



o ——o Migrationskurve;

Abb.3: Migrationskurve des Kontrollrindes S4

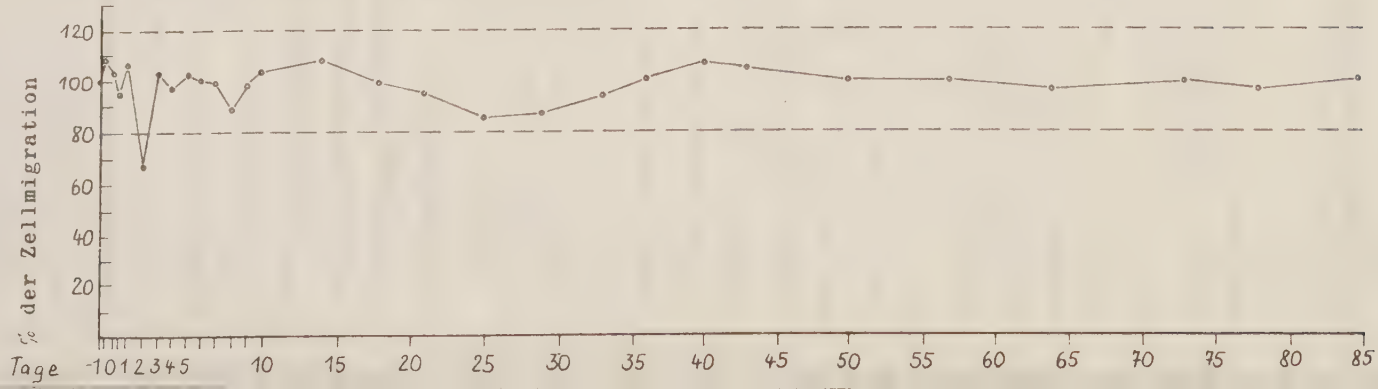


Abb.4: Migrationskurve und Prasitämieverlauf des mit T.congolense erstinfizierten Rindes D3

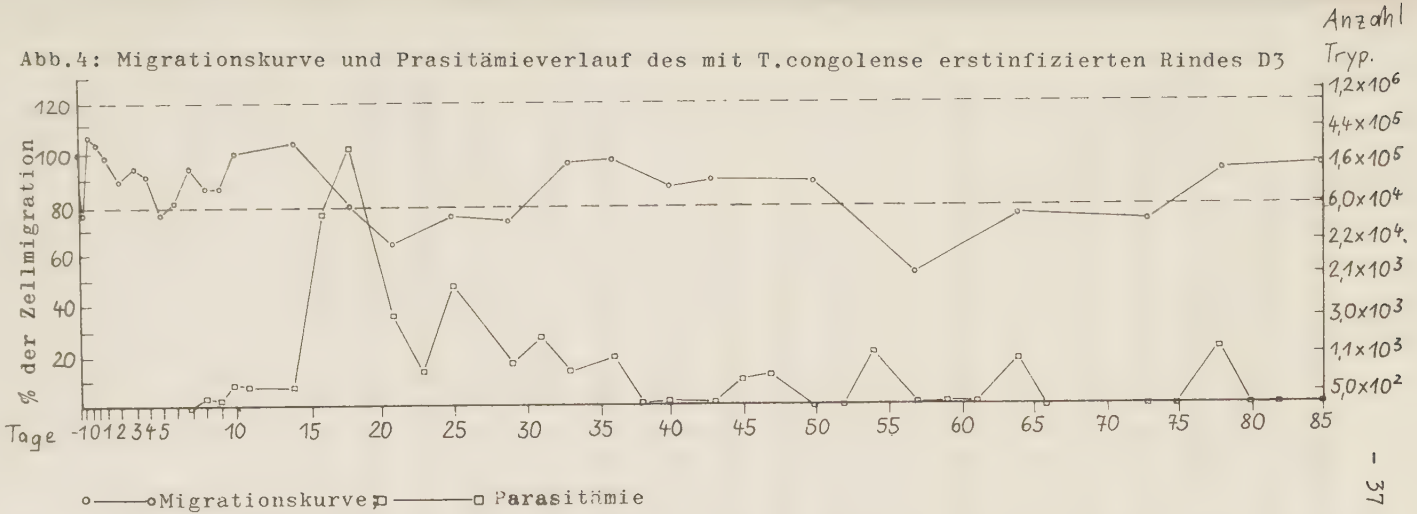
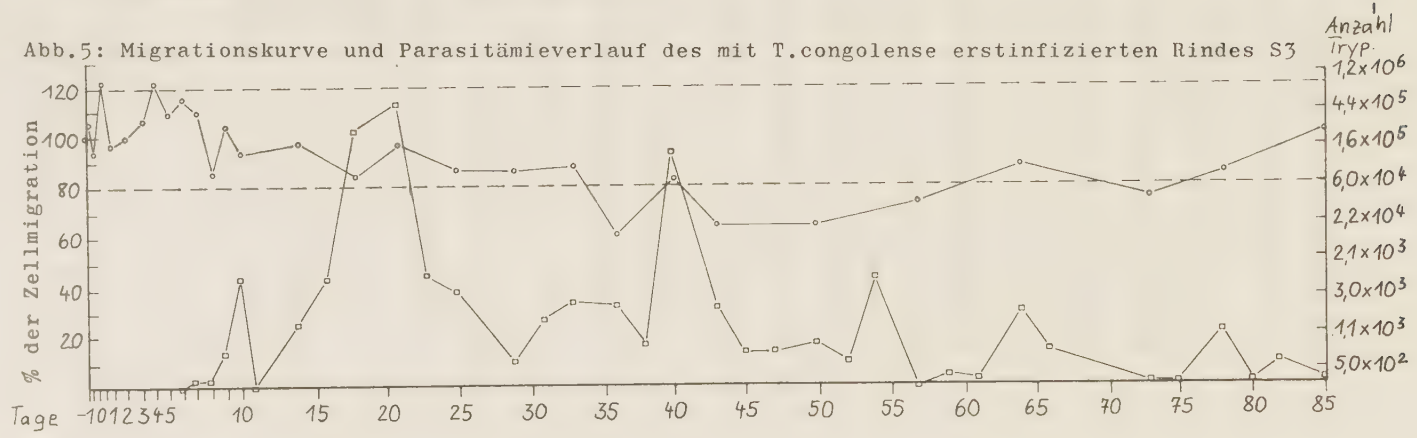


Abb.5: Migrationskurve und Parasitämieverlauf des mit T.congolense erstinfizierten Rindes S3



Das Dahomey-Rind D3 (Abb.4) zeigte nach der Primärinfektion Hemmungsaktivität im Serum vier Stunden nach der Infektion sowie an den Tagen 5, 17 - 29 und 57 - 72. Bei dem ebenfalls erstmals infizierten schwarzbunten Rind S3 (Abb.5) waren am Morgen des Tages nach der Infektion und am 4.Tag schwache Stimulationen der Migration ablesbar, während es an den Tagen 36 - 72 - mit Unterbrechungen an den Tagen 39 und 64 - zu Hemmungen kam. In ihrem Parasitämieverlauf unterschieden sich die beiden Tiere. Bei dem schwarzbunten Rind fielen zwei hohe Schübe am 18. - 21. und am 40.Tag auf. In der übrigen Zeit vor, nach und zwischen diesen Schüben lagen die Parasitenzahlen bei diesem Tier wesentlich höher als bei dem Rind D3, bei dem nach einem einzigen hohen Parsitämieschub die Höhe der Folgeschübe ständig abnahm. Im Gegensatz zu dem Rind D3, bei dem längere parasitenfreie Intervalle zu beobachten waren, wurden bei dem Rind S3 lediglich an zwei Tagen keine Parasiten im Blut gefunden. Die Gewichtszunahme des mit Trypanosomen infizierten schwarzbunten Rindes S3 betrug nicht einmal die Hälfte des gleichaltrigen Kontrolltieres S4. Kurz nach der Trypanosomeninfektion wurde bei dem S3-Tier eine Bronchopneumonie festgestellt, die von einer Stimulation der Granulozytenwanderung begleitet war.

Die reinfizierten Dahomey-Rinder D1 u. D2 (Abb.6 u. 7) zeigten einen ausgeglichenen Verlauf der Migrationsindices bei relativ niedrigen Parasitenzahlen. Das Tier D1 zeigte schwache Hemmungen an den Tagen 8 und 14 und stärkere Hemmungen an den Tagen 57, 72 und 85. Bei dem Rind D2 wurden vor der Behandlung mit Berenil^{R} vom 24. - 32.Tag und am 43.Tag schwache Hemmungen beobachtet. Der Beobachtungszeitraum nach der Behandlung wird im Zusammenhang mit dem ebenfalls behandelten Rind S2 erläutert. Der erste Parasitämieschub war bei beiden reinfizierten Dahomey-Rindern weniger ausgeprägt und hat später stattgefunden als bei dem erstinfizierten Tier D3. Der weitere Parasitämieverlauf war ähnlich wie bei diesem durch abnehmende Parasitenzahlen gekennzeichnet.

Im Gegensatz zu den reinfizierten Dahomey-Rindern zeigten die reinfizierten schwarzbunten Rinder S1 und S2 (Abb.8 u.9) in ihren Migrationsindices starke Abweichungen vom Vertrauensbereich. Beim Rind S1 traten mit Serum Hemmungen an den Tagen 21 - 57 auf, die vom 24. - 32.Tag besonders ausgeprägt waren. Der Parasitämieverlauf nach einer Präpatenzzeit von 15 Tagen war durch zwei hohe Schübe an den Tagen 18 - 21 und 43 gekennzeichnet. Zwischen diesen beiden Schüben und danach traten noch sieben weitere schwächere parasitämische Schübe auf, die jeweils von einem Temperaturanstieg begleitet waren.

Abb.6: Migrationskurve und Parasitämieverlauf des mit T.congolense reinfizierten Rindes D1

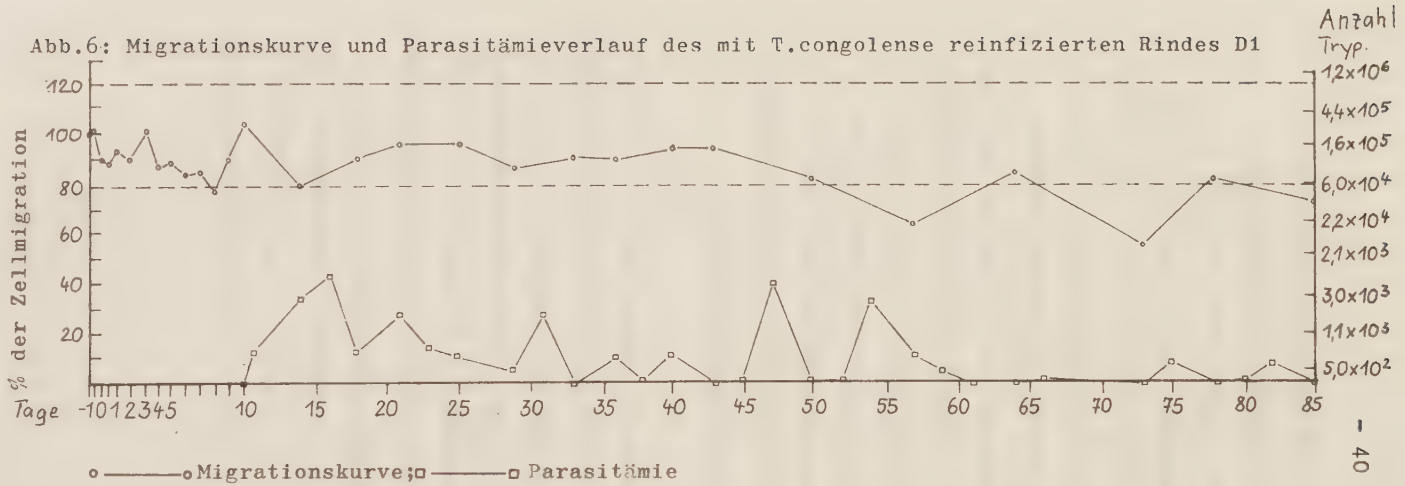


Abb.7: Migrationskurve und Parasitämieverlauf des mit T.congolense reinfizierten Rindes D2

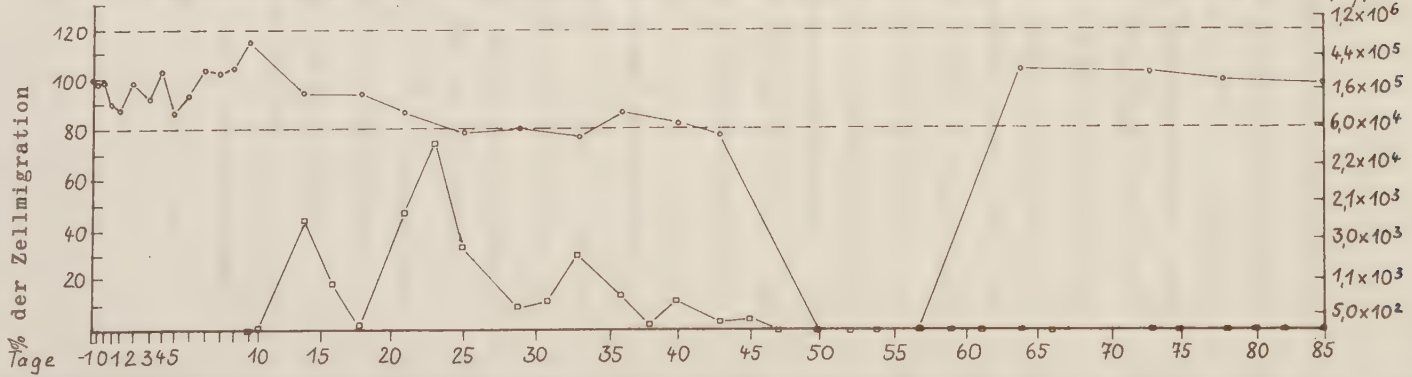


Abb.8: Migrationskurve und Parasitämieverlauf des mit T.congolense reinfizierten Rindes S1

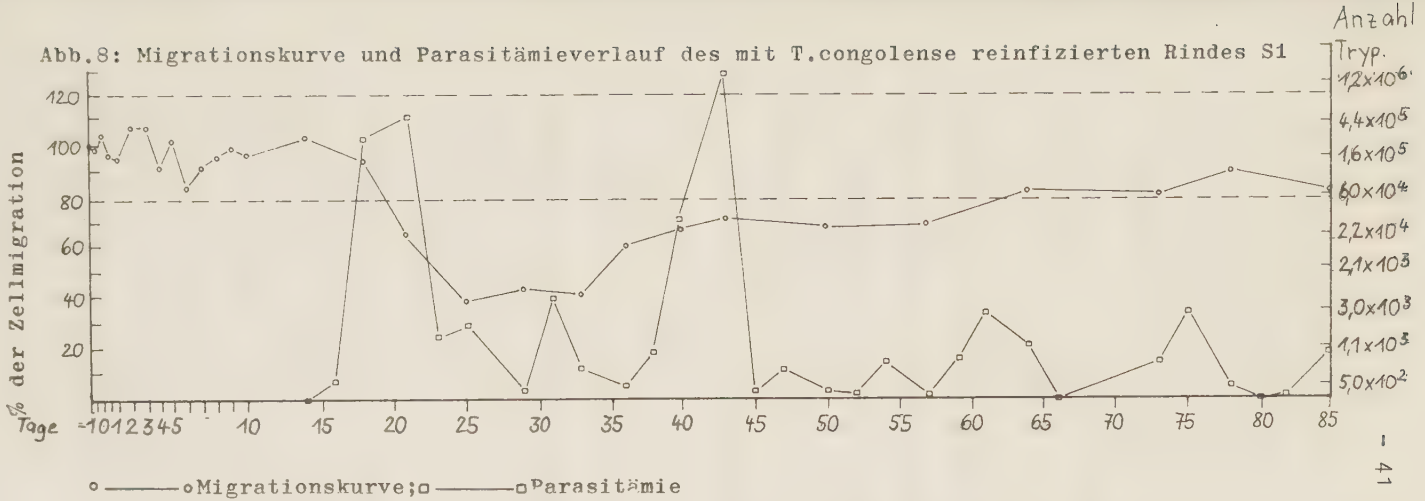
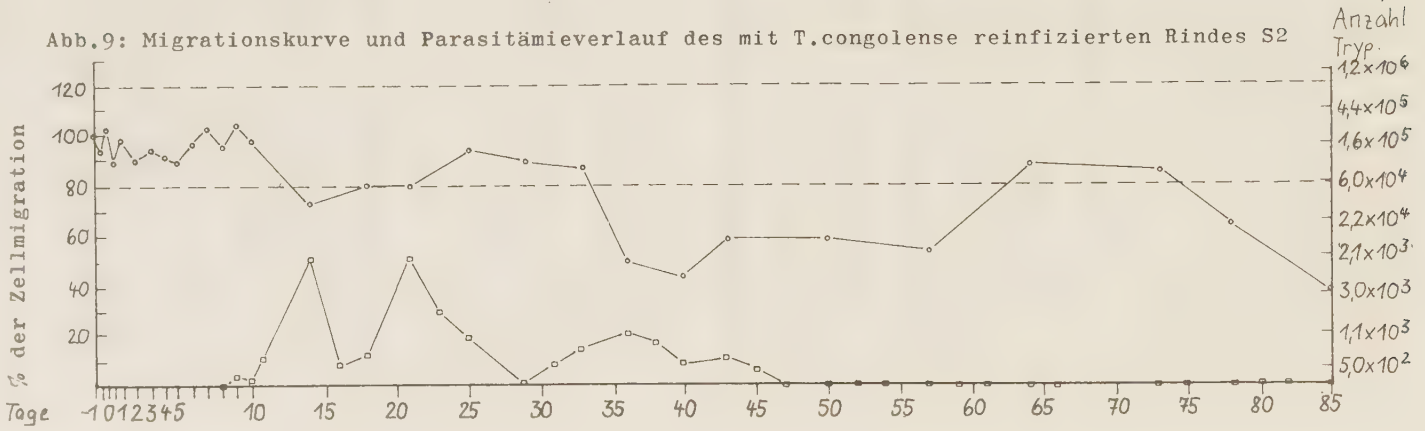


Abb.9: Migrationskurve und Parasitämieverlauf des mit T.congolense reinfizierten Rindes S2



Der Verlauf der Parasitämie des reinfizierten Tieres S2 (Abb.9) glich im Gegensatz zum Tier S1 demjenigen der reinfizierten Dahomey-Rinder. Die klinisch schwere Erkrankung des Tieres S2 fand im Vergleich mit allen anderen Tieren ihren Ausdruck in einem höheren Temperaturniveau und einer schweren progressiven Anämie, die zu einer spezifischen Behandlung zwang. Das Serum dieses Rindes zeigte schwache Migrationshemmungen an den Tagen 14 - 21 und ausgeprägte Hemmungen an den Tagen 36 - 43. Nach der Behandlung mit Berenil^{R} am Tag 44 war die Migration bis zum Tag 57 weiterhin gehemmt und erst am 64.Tag bewegten sich die Werte wieder im Vertrauensbereich. Am 78. und 85. Tag war die Migration erneut gehemmt. Nach der Behandlung wurden keine Parasiten mehr nachgewiesen.

Zu Vergleichszwecken wurde das Rind D2 (Abb.7) ohne dringende klinische Indikation gleichzeitig mit dem Tier S2 mit Berenil^{R} behandelt. Die Anämie betrug zu diesem Zeitpunkt 28%. Bei dem Dahomey-Rind D2 fiel eine totale Hemmung der Granulozytenmigration mit den Seren im Zeitraum vom 50. - 57. Tag besonders auf. Eine totale Hemmung wurde bei keinem der übrigen Versuchsrinder zu irgendeinem Zeitpunkt beobachtet. Diese starke Hemmung steht deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit mit der Berenil^{R}-Behandlung im Zusammenhang. Dieses Ergebnis der vollständigen Hemmung wurde in wiederholten Untersuchungen mit verschiedenen Granulozytenpools an verschiedenen Tagen bestätigt. Nach dieser vollständigen Hemmung lagen die Migrationswerte dann wieder im

Vertrauensbereich. Beide Tiere S2 und D2 waren nach der Berenil^{R}-Behandlung parasitenfrei. Es kam zu einer klinischen Besserung, wobei die Erythrozytenzahlen allmählich wieder zunahmen und die Temperaturkurve keinen größeren Schwankungen mehr unterworfen war.

4.2. Zweite Versuchsreihe

In der zweiten Versuchsreihe befanden sich drei Rinder der Rasse Deutsches Fleckvieh (F1 - F3) und drei F_1-Nachkommen aus einer Kreuzung zwischen Deutschem Fleckvieh und N'Dama (K1 - K3). Die Tiere F1, F2, K1 und K2 wurden alle erstmals mit $2x10^6$ beweglichen und infektionsfähigen Trypanosomen (T.congolense) infiziert. Die Rinder F3 und K3 dienten als nicht infizierte Kontrolltiere. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich bis zum 30.Tag nach der Infektion. Die Serumproben für den Migrationshemmungstest wurden am Tag der Infektion und an den beiden Tagen danach zweimal täglich und ab dem dritten Tag einmal täglich gewonnen. Die klinischen und parasitologischen Untersuchungen wurden ebenfalls einmal täglich durchgeführt.

Die Migrationshemmwerte des Kontrolltieres K3 (Abb.10) bewegen sich, wie schon die der Kontrolltiere der ersten Versuchsreihe, ausnahmslos innerhalb des Vertrauensbereiches.

Das Serum des Fleckviehkontrolltieres F3 (Abb.11) stimulierte die Granulozytenwanderung teilweise stark an den

Abb.10: Migrationskurve des Kontrollrindes K3

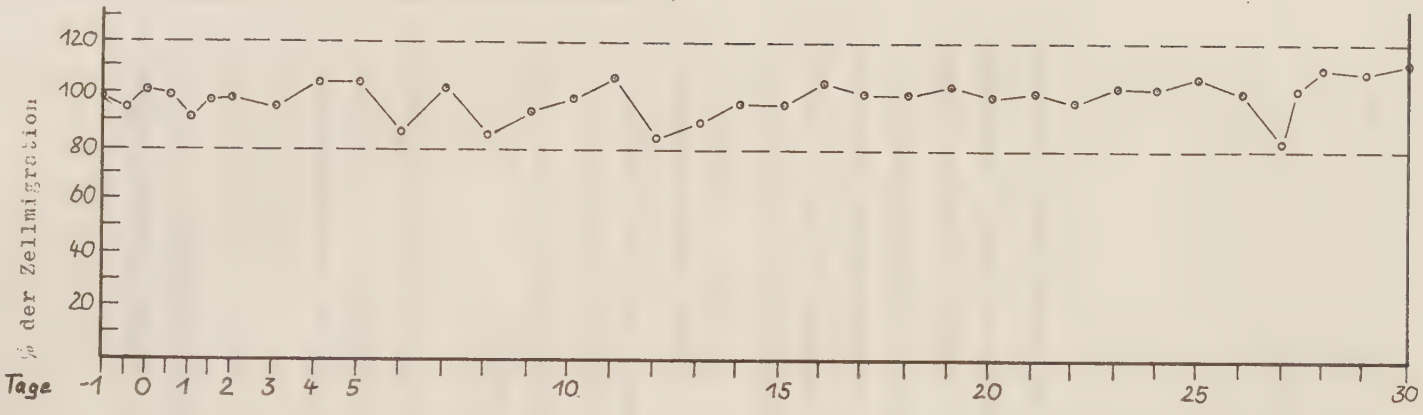
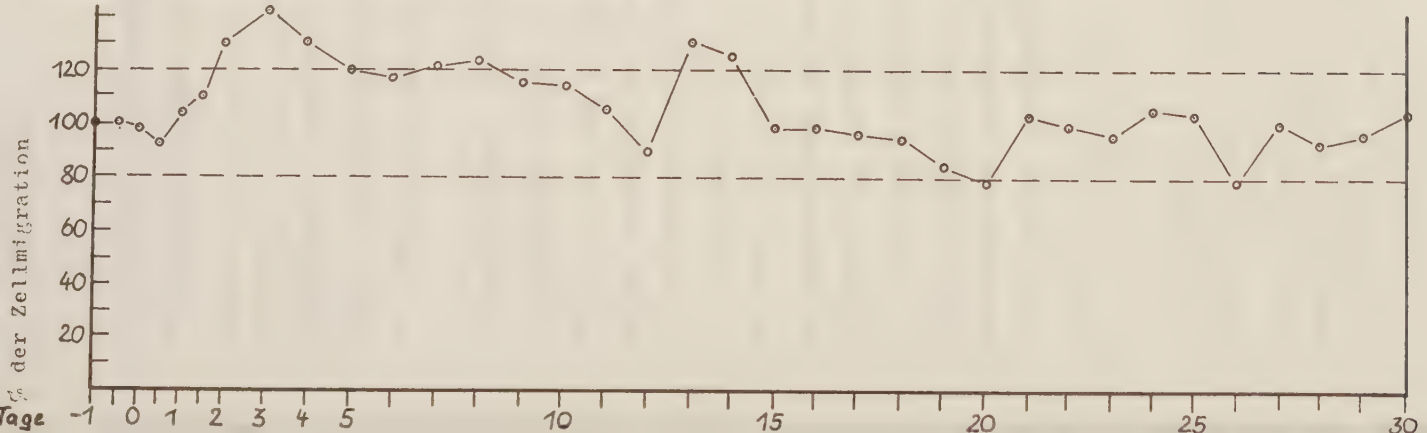


Abb.11: Migrationskurve des Kontrollrindes F3



Tagen 3, 4, 8, 13 und 14. Eine schwache Wanderungshemmung wurde an den Tagen 20 und 26 beobachtet. Es muß vermerkt werden, daß dieses Kontrolltier zusammen mit den übrigen Fleckvieh-Rindern kurz vor Versuchsbeginn neu zugekauft wurde und am Anfang des Versuchs an einer Bronchopneumonie mit Temperaturen über 39°C erkrankte. Am 14.Tag stieg die Temperatur auf 40°C. Am gleichen Tag war auch die Granulozytenmigration stark stimuliert. Ein Zusammenhang mit einer Trypanosomeninfektion wurde durch die parasitologischen Untersuchungen ausgeschlossen. Nach vier Tagen fiel die Temperatur dann auf Werte unter 39°C ab. Gleichzeitig fiel der Migrationsindex in den Vertrauensbereich ab.

Bei allen mit Trypanosomen infizierten Rindern (F1, F2, K1, K2) erreichte der erste Parasitämieschub an den Tagen 7 - 10 seinen Höhepunkt. In der Verlaufskurve der Hemmwerte traten bei den einzelnen Tieren Unterschiede auf.

Mit Serum des Rindes F1 (Abb.12) war eine Hemmung bereits 8 Stunden nach der Infektion nachweisbar. Die stärksten Hemmwerte wurden nach 30 Stunden und am 4.Tag festgestellt. Nach dem ersten Parasitämieschub stabilisierten sich die Migrationswerte im Hemmbereich mit einem Migrationsindex von 69 bis 85%. In dieser Zeit wurden weitere hohe Parasitämieschübe beobachtet. In Übereinstimmung mit allen anderen Rindern in dieser Versuchsreihe waren die Parasitenzahlen ab dem 28. bzw. 29.Tag auf niedrige Werte abgefallen.

Abb.12: Migrationskurve und Parasitämieverlauf des mit T.congolense erstinfizierten Rindes F1

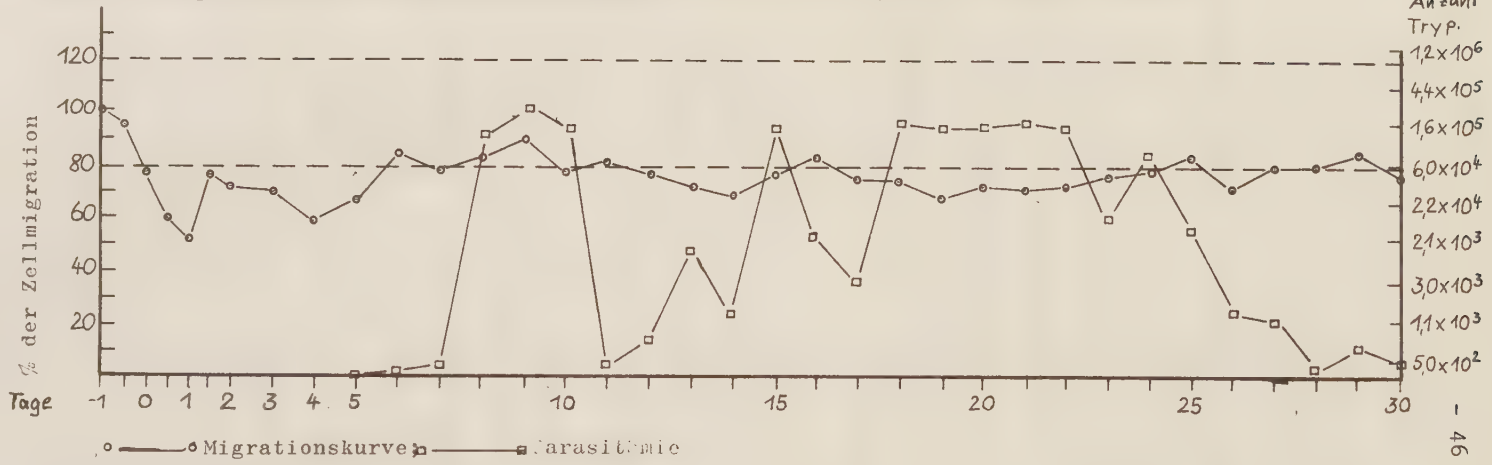
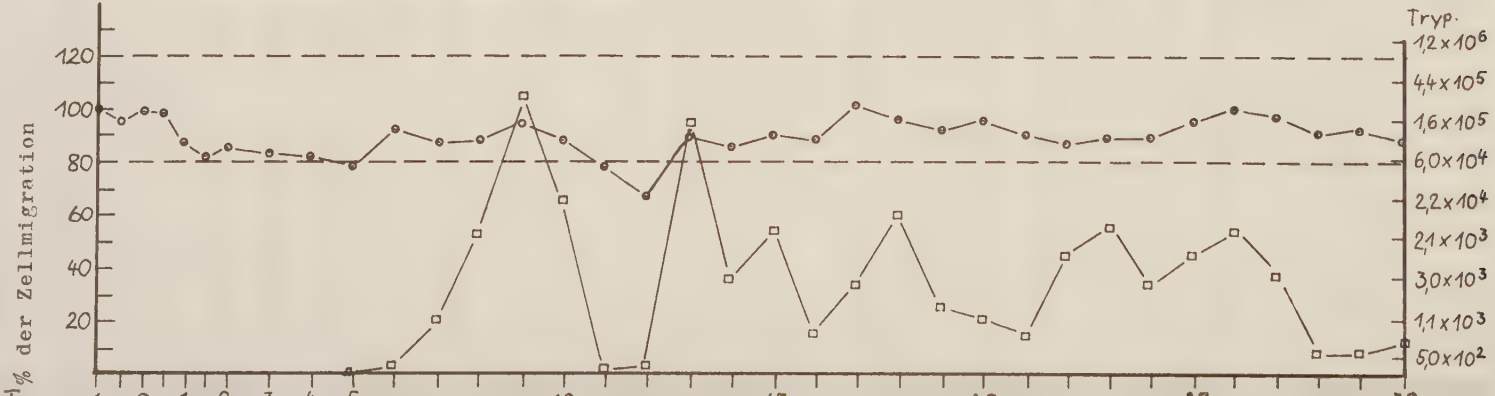


Abb.13: Migrationskurve und Parasitämieverlauf des mit T.congolense erstinfizierten Rindes F2



Im Gegensatz zu dem Rind F1 traten bei dem Rind F2 (Abb.13) Hemmungen der Granulozytenmigration nur an den Tagen 5, 11 und 12 nach der Infektion auf. Bei diesem Tier erreichten die Parasitämiegipfel nach zwei anfänglichen hohen Schüben am 8. und 14. Infektionstag nicht mehr eine solche Höhe wie bei dem Rind F1.

Bei dem Kreuzungstier K1 (Abb.14) traten an den Tagen 9 - 11 starke Hemmungen der Migration auf. Ab dem 16.Tag war die Migration bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes leicht gehemmt. Die Parasitämie bei diesem Tier war gekennzeichnet durch einen hohen Anfangsschub und stetig sinkende Parasitenzahlen bei den Folgeschüben.

Bei dem Rind K2 (Abb.15)war eine erste Migrationshemmung am 3.Tag und weitere Hemmungen nur an den Tagen 8 - 14 zu beobachten. Nach einem ersten Parasitämieschub hielten sich die Parasitenzahlen bei diesem Tier vom 13. bis zum 24.Tag auf einem hohen Plateau.

Auffallend war, daß der Temperaturverlauf bei den beiden Kreuzungstieren mit Ausnahmen bis zum 13.Tag trotz weiterer Parasitämieschübe durch niedrige Temperaturen gekennzeichnet war. Bei den beiden Kreuzungstieren wurde eine im Vergleich mit den Fleckviehrindern weniger ausgeprägte Anämie registriert.

Abb. 14: Migrationskurve und Parasitämieverlauf des mit T.congolense erstinfizierten Rindes K1

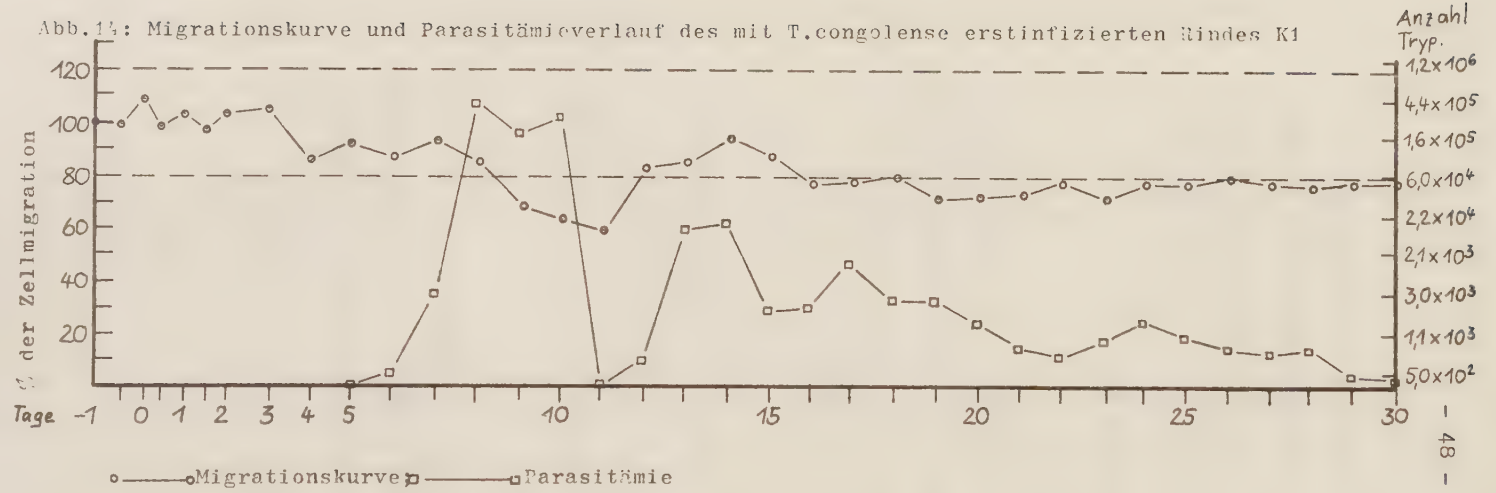
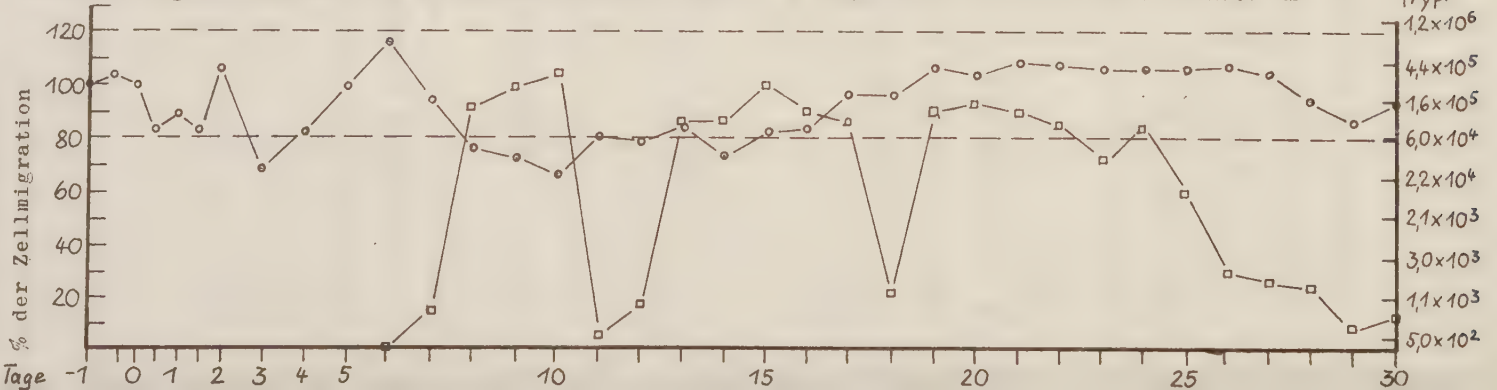


Abb. 15: Migrationskurve und Parasitämieverlauf des mit T.congolense erstinfizierten Rindes K2



4.3. Dritte Versuchsreihe

Die dritte Versuchsreihe bestand aus sechs Rindern der Rasse Dahomey. Die Rinder D4 (3.Versuchsreihe), D5 und D6 wurden erstmals mit $2x10^5$ klonierten, beweglichen und infektionsfähigen Trypanosomen (T.congolense) infiziert. Die Tiere D7 und D8 erhielten erstmals $2x10^5$ bewegliche und infektionsfähige Trypanosomen (T.brucei) subkutan. Das Tier D9 wurde nicht infiziert und diente als Kontrolle. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich bis zum 30. Tag nach der Infektion. Die Gewinnung der Serumproben erfolgte am Tag der Infektion und an den beiden Tagen danach zweimal täglich, später nur noch einmal täglich.

Mit Serum des Kontrolltieres D9 (Abb.16) wurden Hemmungen der Granulozytenmigration am 7., 11., 12., 15. und am 18. Tag beobachtet. Am Tag 29 war die Wanderung leicht stimuliert. Auffallend war bei diesem Tier eine ständige Zunahme der Körpertemperatur von anfangs 38,5°C auf 39,8°C bis zum 15.Tag verbunden mit einer Abnahme der Erythrozytenzahlen um 42%. Dies deutet darauf hin, daß bei diesem Tier eine Erkrankung stattgefunden haben muß, durch die möglicherweise auch die beobachteten Hemmungen der Granulozytenwanderung bedingt waren. Ein Zusammenhang mit einer Trypanosomeninfektion wurde durch parasitologische Untersuchungen ausgeschlossen. Auch der Mäuseinokulationsversuch verlief negativ.

Abb.16: Migrationskurve des Kontrollrindes D9

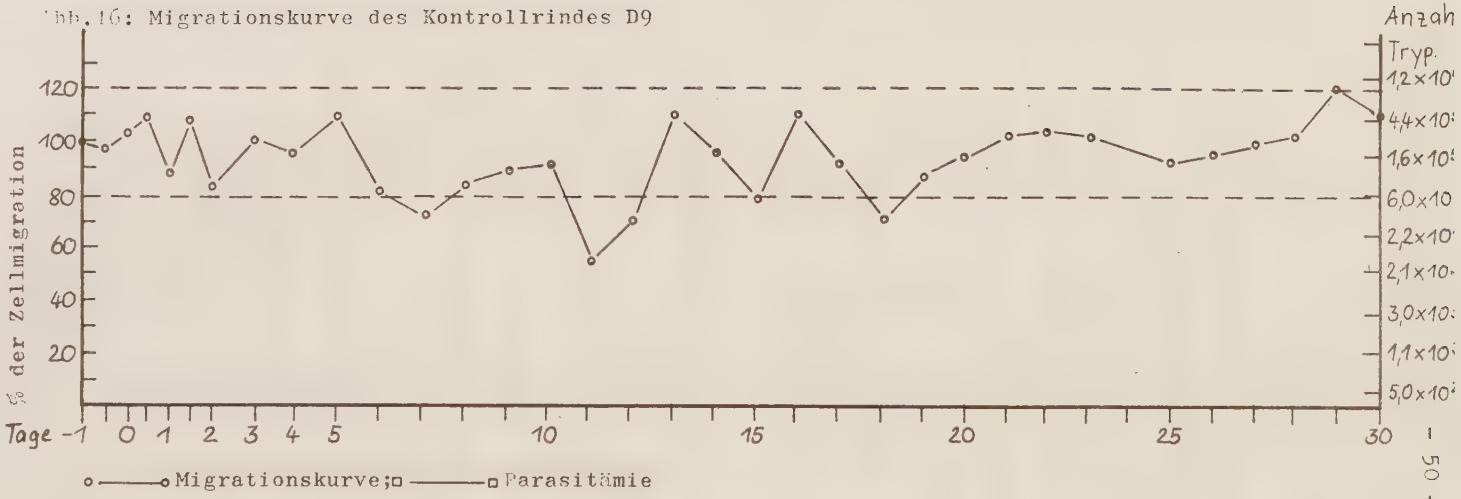
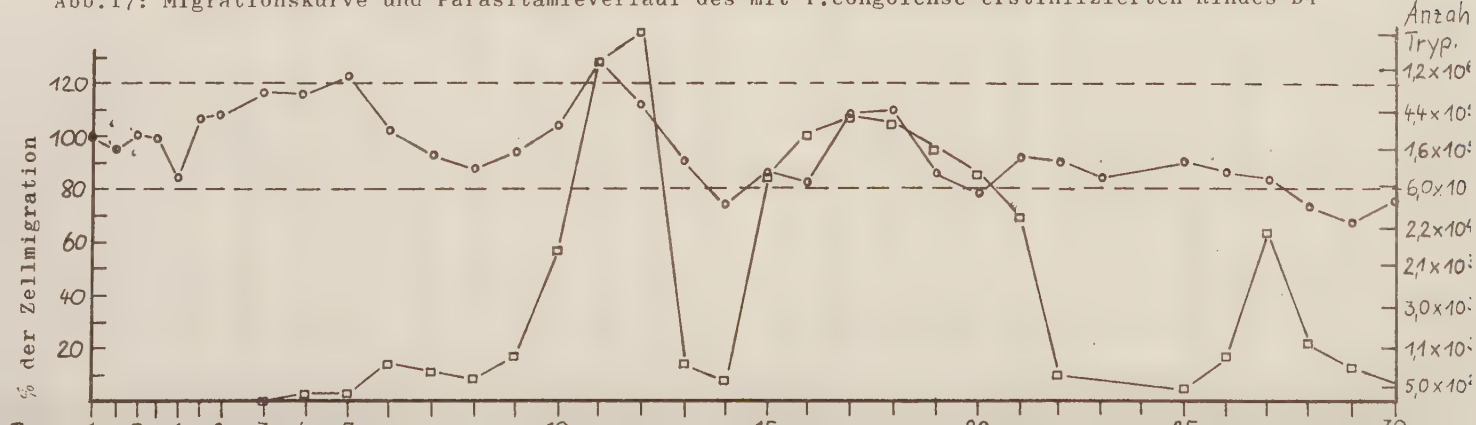


Abb.17: Migrationskurve und Parasitämieverlauf des mit T.congolense erstinfizierten Rindes D4



Bei dem Rind D4 (3.Versuchsreihe) (Abb.17) war die Granulozytenmigration am 5. und am 11.Tag stimuliert. Hemmungen wurden nur nach dem ersten Parasitämieschub an den Tagen 14, 20 und 28 - 30 festgestellt.

Bei dem Rind D5 (Abb.18) war ebenfalls in der Zeit vor dem ersten parasitämischen Schub eine Stimulation der Wanderung von Granulozyten zu verzeichnen. Mit Serum von den Tagen 7, 10 und 16 war die Migration gehemmt. Im späteren Zeitraum bewegten sich die Migrationswerte bis zum 30.Tag im Vertrauensbereich. Bei der Beurteilung der Hemmungen bei diesem Tier muß beachtet werden, daß die Seren von den Tagen 7 - 11 und 14 - 17 die Granulozyten agglutinierten und die Wanderungshemmungen sehr wahrscheinlich durch diese Agglutinationen beeinflußt waren.

Serum des Rindes D6 (Abb.19) stimulierte zu keinem Zeitpunkt die Granulozytenmigration. Hemmungen traten wie bei D4 (3.Versuchsreihe) nur im Bereich nach der ersten Parasitämiezacke an den Tagen 13, 15, 19, 25 und 28 - 30 auf. Insgesamt gesehen waren bei diesem Tier wie bei D4 (3.Versuchsreihe) die Migrationswerte nach dem ersten Parasitämieschub niedriger als vorher, während bei D5 Hemmwerte nur in dem Zeitraum der ersten beiden Parasitämieschübe festgestellt werden konnten.

Abb.18: Migrationskurve und Parasitämieverlauf des mit T.congolense erstinfizierten Rindes D5

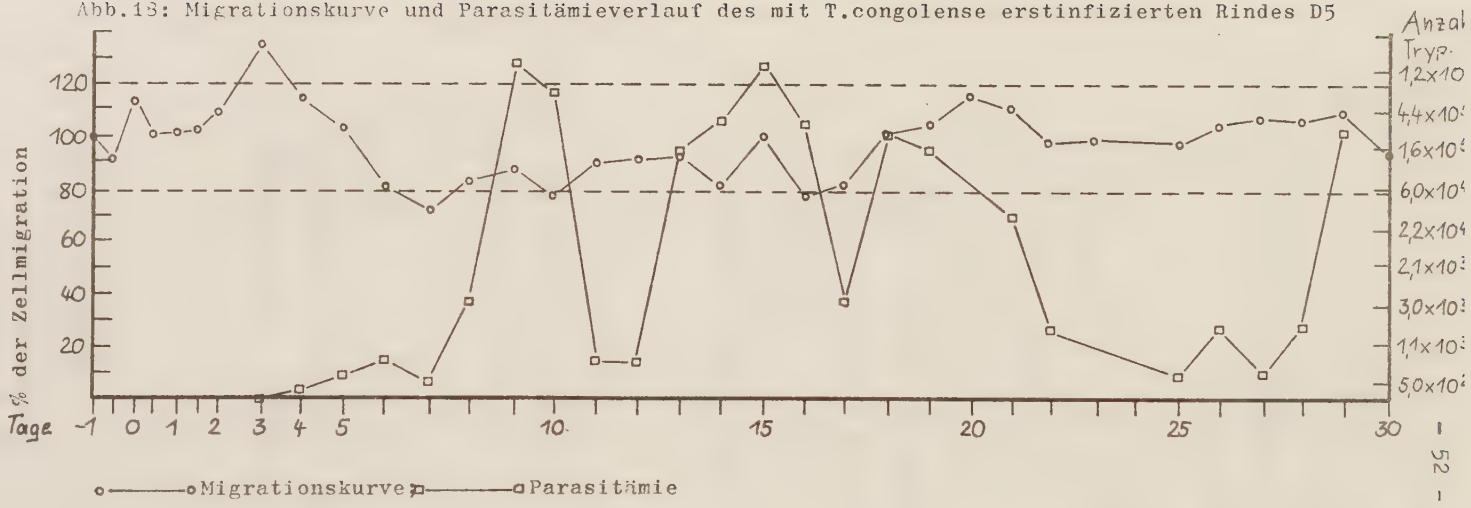
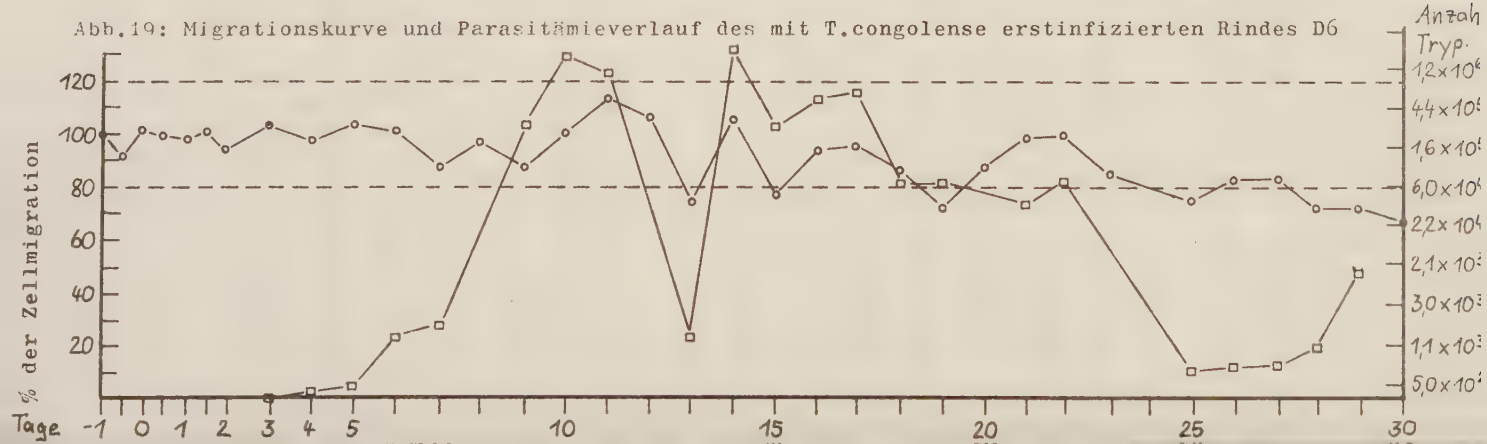


Abb.19: Migrationskurve und Parasitämieverlauf des mit T.congolense erstinfizierten Rindes D6



Der Parasitämieverlauf war bei allen mit T.congolense infizierten Rindern in dieser Versuchsreihe ähnlich. Nach einer Präpatenzzeit von drei Tagen entwickelte sich im Bereich vom 9. - 12.Tag jeweils ein hoher erster parasitämischer Schub, dem sich nach einem Intervall von 1 - 2 Tagen mit niedrigen Parasitenzahlen ein unterschiedlich langer Zeitraum mit hoher Parasitämie anschloß. Nach einigen weiteren Tagen mit schwach ausgeprägter Parasitämie stiegen am Ende des Beobachtungszeitraumes die Parasitenzahlen bei allen drei Rindern (D4 (3.Versuchsreihe) - D 6) wieder an. Die Parasitämiekurve in dieser Versuchsreihe unterschied sich damit deutlich von der des ebenfalls erstmals mit T.congolense infizierten Tieres D3 aus der ersten Versuchsreihe, bei dem die Parasitämieschübe im Verlauf der Infektion immer mehr abnahmen.

Eine Hemmung der Granulozytenmigration konnte bei dem mit T.brucei infizierten Tier D7 (Abb.20) am 7. und 10.Tag beobachtet werden. Die Seren ab dem 11.Tag agglutinierten die Granulozyten am Rand des Agarosetropfens so stark, daß ein Auswandern weiterer Zellen aus dem Agarosetropfen unmöglich war. Diese Agglutination war nicht unspezifisch, weil sie mit drei unterschiedlichen Granulozytenpools an verschiedenen Tagen wiederholt werden konnte. Einige Seren dieses Tieres vor und nach dem 11.Infektionstag wurden auch mit Erythrozyten von acht Schweinen auf ihren Gehalt an agglutinierenden Antikörpern untersucht. Die untersuchten Seren aus der Zeit nach dem 11.Infektionstag agglutini-

Abb.20: Migrationskurve und Parasitämieverlauf des mit T.brucei erstinfizierten Rindes D7

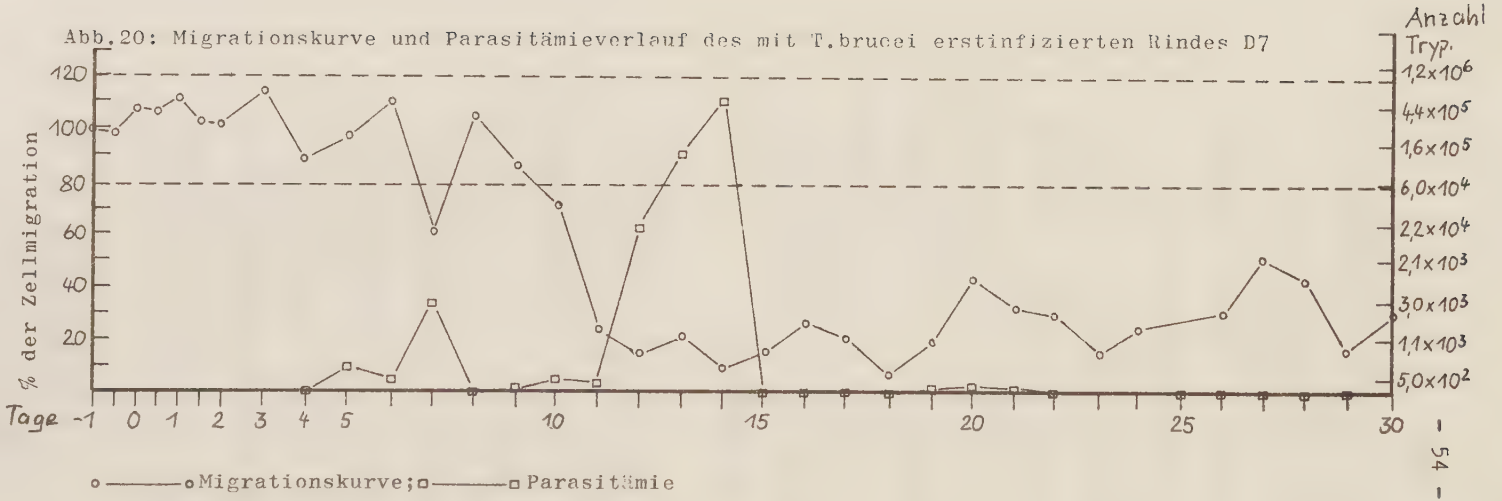
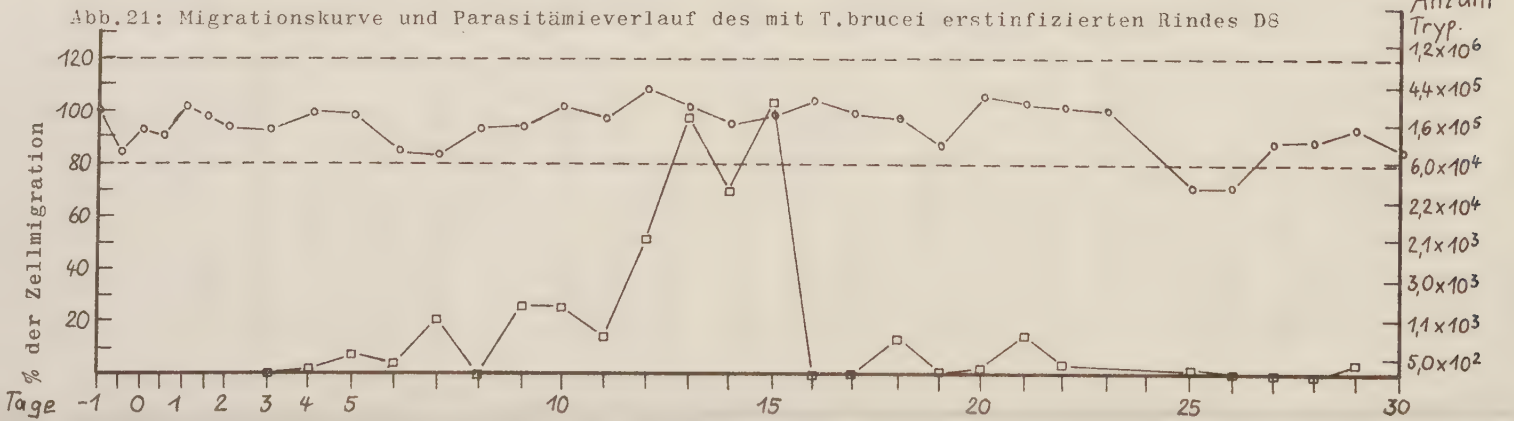


Abb.21: Migrationskurve und Parasitämieverlauf des mit T.brucei erstinfizierten Rindes D8



nierten die Erythrozyten aller acht Schweine bis zu einer Verdünnung von 1:4, während mit Seren vor dem 11.Infektionstag nur in unverdünntem Zustand zum Teil Agglutinationen gesehen werden konnten. Ein Zusammenhang mit dem J-Blutgruppensystem des Rindes konnte serologisch ausgeschlossen werden.

Bei dem ebenfalls mit T.brucei infizierten Rind D8, bei dem es nur an den Tagen 25 und 26 zu Hemmungen der Migration kam, wurden derartige Agglutinationen nicht beobachtet.

Die mit T.brucei infizierten Rinder zeigten im gegenseitigen Vergleich einen ähnlichen Parasitämieverlauf. Nach einer Präpatenz von 3 - 4 Tagen kam es zu dem einzigen Parasitämiegipfel erst in dem Bereich vom 13. - 15.Tag. Danach wurde nur zeitweise eine ganz geringe Zahl von Trypanosomen im Blut nachgewiesen.

4.4. Hämatologische Untersuchungen

Blutausstrichpräparate standen nur aus der zweiten und dritten Versuchsreihe zur Verfügung. Bei der Differenzierung der Blutbilder der Rinder aus der zweiten Versuchsreihe fiel auf, daß bei allen Tieren die absolute Zahl der segmentkernigen Granulozyten schon während der Präpatenz und im weiteren Infektionsverlauf ständig abnahm. Die Abnahme der segmentkernigen Granulozyten war am auf-

fälligsten bei den Rindern F2 und K1, den Tieren also, die in dieser Versuchsreihe die Parasitämie am besten begrenzen konnten. Bei diesen beiden Tieren kam es mit Beginn der dritten Woche bereits zu Erholungstendenzen in der Anzahl segmentkerniger Granulozyten, während bei den Tieren F1 und K2 deren Anzahl bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes allmählich immer weiter abnahm. Der Kurvenverlauf bei den eosinophilen Granulozyten war unauffällig. Die absolute Zahl der kleinen, reifen Lymphozyten sank in der Präpatenz ebenfalls ab und nahm ab dem ersten Parasitämiepeak wieder zu. Zu Beginn der dritten Infektionswoche erreichten die Lymphozytenzahlen wieder die Ausgangswerte. Anschließend kam es bei allen Tieren zur Ausbildung einer leichten relativen Lymphozytose bezogen auf die Ausgangswerte, die außer bei dem Rind F2 bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes anhielt. Die Zahl der großen Lymphozyten war im Infektionsverlauf keinen auffälligen Veränderungen unterworfen. Bei allen Rindern außer den Kontrolltieren konnte lediglich Ende der dritten Woche eine einmalige Erhöhung der Zahl großer Lymphozyten festgestellt werden, die jedoch offenbar keinen Einfluß auf die Höhe der Parasitenzahlen nahm. Ab Mitte der dritten Infektionswoche konnte eine Zunahme der Monozyten beobachtet werden. Bei dem Tier K1 war diese Zunahme am wenigsten ausgeprägt, bei dem Tier F2 am stärksten. Es muß dabei aber beachtet werden, daß auch bei dem Kontrolltier der Fleckviehrasse im fraglichen Zeitraum die Monozytenzahlen anstiegen.

Von allen in der dritten Versuchsreihe mit Trypanosomen infizierten Rindern kam es lediglich bei dem Tier D5 zu einer leichten Neutropenie zwischen dem 12. und 22. Infektionstag. Bei den beiden anderen mit T.congolense infizierten Rindern D4 (3.Versuchsreihe) und D6 wurden zwar tageweise auch niedrigere Granulozytenzahlen ermittelt, jedoch waren immer auch wieder Tage mit normalen Granulozytenzahlen zu verzeichnen. Die Granulozytenzahlen der mit T.brucei infizierten Rinder D7 und D8 wurden im Beobachtungszeitraum durch die Infektion überhaupt nicht beeinflußt. Die Ausgangszahlen der eosinophilen Granulozyten lagen bei den Dahomey-Rindern dieser Versuchsreihe mit 14% vergleichsweise hoch. Die absoluten Eosinophilenzahlen nahmen bei den Rindern D4 und D6 allmählich bis zum Ende der dritten Infektionswoche ab. Bei D5 fiel die Anzahl der Eosinophilen bereits am Beginn der Parasitämie stark ab. Bei dem Tier D6, bei dem die Ausgangszahlen nicht so hoch lagen, stieg die Zahl eosinophiler Granulozyten am Beginn der 4.Infektionswoche stark an. Bei den mit T.brucei infizierten Rindern war die Zahl eosinophiler Granulozyten im Infektionsverlauf keinen großen Schwankungen unterworfen. Die Lymphozytenzahlen sanken in dieser Versuchsreihe bei allen Rindern, ausgenommen bei D4 (3.Versuchsreihe)bis in die Zeit zwischen Ende der Präpatenz und erstem Parasitämieschub ab und stiegen dann bis zum Ende der dritten Infektionswoche allmählich wieder auf Werte um oder leicht über den Ausgangszahlen an. Bei dem Tier D4 (3.Versuchsreihe) waren

die Lymphozytenzahlen nur in der dritten Infektionswoche vermindert. Die Zahl der großen Lymphozyten war wie in der zweiten Versuchsreihe keinen nennenswerten Schwankungen unterworfen. Bei den Monozytenzahlen war im Gegensatz zur 2.Versuchsreihe kein Anstieg zu verzeichnen.

Zwischen dem Verlauf der Migrationskurven und dem Differentialblutbild, insbesondere zur Zahl der polymorphkernigen Leukozyten sowie der Zahl kleiner und großer Lymphozyten,war in beiden Versuchsreihen keine Korrelation zu erkennen.

Zu Vergleichszwecken wurden noch Differentialblutbilder von zwei weiteren Deutschen Schwarzbunten Rindern herangezogen, die mit $4x10^5$ klonierten, beweglichen und infektionsfähigen Trypanosomen (T.congolense, Stamm 423 Clon O) infiziert waren. Bei diesen Rindern kam es im Beobachtungszeitraum bis zum 30.Tag nach der Infektion zur Ausbildung von drei hohen Parasitämiezacken. Die Seren dieser Rinder wurden nicht im Migrationshemmungstest untersucht. Der Verlauf der Zahlen kleiner Lymphozyten war in diesem Versuch mit schwarzbunten Rindern auffallend anders, als in der zweiten und dritten Versuchsreihe. Am 2.Tag nach der Infektion waren die Lymphozytenzahlen stark erhöht und nahmen dann bis zum 9.Tag,an dem es zur Ausbildung des ersten Parasitämieschubes kam, auf Werte ab, die mindestens um die Hälfte unter den Ausgangszahlen lagen. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von

30 Tagen hielten sich die Lymphozytenzahlen dann auf diesem niedrigen Niveau. HEINRICH (1984) nimmt an, daß die Anzahl der Lymphozyten für den Verlauf der Parasitämie von Bedeutung ist. Die Zahl der übrigen Leukozyten verhielt sich in diesem Versuch ähnlich wie in der zweiten und dritten Versuchsreihe.

5. Diskussion

5.1. Besprechung der Methodik

Bei der zellulären Abwehr kommt es nach Antigen-Belastung zur Bildung von Mediatoren, die im Blutserum nachweisbar sind und die Funktion der Leukozyten beeinflussen. Einige dieser Leukozytenmediatoren wirken stimulierend, andere hemmend auf die Zellmigration. Bei dem zur Messung der Migration von Granulozyten in der vorliegenden Arbeit gewählten Untersuchungsverfahren handelt es sich um ein sehr empfindliches Testsystem zur Erfassung zellulärer Immunreaktionen. Voraussetzung dafür ist die Einhaltung gleichbleibender und genau definierter Versuchsbedingungen. Besonders zu beachten sind die Auswahl der Zielzellen, der pH-Wert des Testansatzes, der Serumzusatz zu den Kulturmedien sowie die Beurteilung und Auswertung der Zellmigration.

Rindergranulozyten mit erhaltener Fähigkeit zur Migration in ausreichender Zahl zu gewinnen, war nicht möglich. Deshalb konnten die zu untersuchenden Rinderseren auf ihren Mediatorengehalt weder gegen homologe Granulozyten nicht infizierter Rinder, noch gegen autologe Granulozyten infizierter Rinder geprüft werden. Die Isolierung

von Granulozyten aus dem peripheren Blut von Rindern ist mit der beschriebenen Methode zur Isolierung von Schweinegranulozyten nicht möglich, da die Rindererythrozyten weder mit Dextran noch mit Polyvinylpyrrolidon in angemessener Zeit zur Sedimentation gebracht werden können (OTTO 1970).

Aus diesem Grund wurde der Versuch unternommen, durch Modifizierung des Uromiro-Dichtegradienten eine Trennung der Rindergranulozyten von den übrigen zellulären Bestandteilen des Blutes im Zentrifugationsverfahren zu erreichen. FERRANTE u. THONG (1978, 1980) ist es durch eine Änderung des Dichtegradienten in einem Arbeitsgang gelungen, Granulozyten und Lymphozyten gleichzeitig aus dem Blut von Mensch und Pferd zu isolieren. Auch MOLNAR et al. (1981) gelang es, mit einem modifizierten Dichtegradienten ohne vorherige Dextransedimentation Granulozyten aus dem Blut des Menschen zu isolieren. In Vorversuchen zu der vorliegenden Arbeit war eine Isolierung von Rindergranulozyten im Dichtegradientenbereich s = 1,076 bis 1,150 nicht möglich. In einem Dichtegradienten von s = 1,119 fanden sich relativ viele Granulozyten im Sediment, während die überwiegende Mehrzahl der Erythrozyten sowie alle Thrombozyten und mononukleären Zellen im Überstand flotierten. Die Kontamination der Granulozytenfraktion mit Erythrozyten war jedoch immer noch so stark, daß die Granulozyten nur durch anschließende zweimalige Hämolyse mit 0,85%iger NH_4Cl-Lösung isoliert werden konnten.

Die im Farbausschlußtest mit Trypanblau ermittelte Vitalität der isolierten Rindergranulozyten betrug 99 - 100%. Im Migrationstest waren jedoch von $1x10^6$ Zellen pro Agarosetropfen bestenfalls noch einige hundert in der Lage, aus dem Agarosetropfen in das umgebende Medium auszuwandern. Eine ähnliche Beobachtung bei Granulozyten des Menschen machten auch MOLNAR et al. (1981). Sie stellten fest, daß trotz im Trypanblauausschlußverfahren ermittelter Vitalität der Granulozyten die Funktion der Granulozyten eingeschränkt sein kann. Die nahezu aufgehobene Fähigkeit zur Migration kann nur durch Einflüsse während der Isolierungsmethode erklärt werden, da sowohl Granulozyten von infizierten Rindern als auch von Kontrollrindern in ihrem Wanderungsvermögen eingeschränkt waren. Die dafür verantwortliche Funktionsbeeinträchtigung der Zellen ist wahrscheinlich durch die lange Exposition der Zellen in der Ammoniumchloridlösung sowie die wiederholt erforderlichen Zentrifugationen bedingt.

CARLSON u. KANEKO (1973), NAYLOR u. LITTLE (1975) und ROTH u. KÄBERLE (1981) bedienten sich bei der Isolierung der Rindergranulozyten einer Kurzzeithämolyse der Erythrozyten mit Aqua dest. DOOLEY u. TAKAHASHI (1981) weisen jedoch darauf hin, daß die Anwendung hypotoner Lösungen bei Granulozyten des Menschen in weniger als 30 Sekunden zu stärksten, irreversiblen Beeinträchtigungen der Granulozyten führt. Die Fähigkeit der Granulozyten zur Migration

wird von diesen Autoren als der empfindlichste Indikator für eine Granulozytenfunktionsstörung angesehen. Die Hämolyse der Erythrozyten mit Aqua dest. bei der Isolierung von Rindergranulozyten ist deshalb für deren Verwendung im Migrationstest nicht vertretbar und wurde aus diesem Grund nicht angewendet.

Da aus den vorgenannten Gründen Rindergranulozyten als Zielzellen nicht zur Verfügung standen, mußte nach einer geeigneten heterologen Zielzelle gesucht werden. In Vorversuchen wurden Granulozyten von Mensch, Schwein und Pferd im Migrationshemmungstest mit zwei unterschiedlichen, lymphokinhaltigen Kulturüberständen von humanen Lymphozyten geprüft. Von den untersuchten Zellisolaten unterschiedlicher Herkunft bildeten die Schweinegranulozyten unter den gegebenen Testbedingungen die dichtesten und größten Migrationshöfe.

Der LIF-Faktor (Leukocyte Migration Inhibitory Factor) ist nicht speziesspezifisch (BENDTZEN u. BENDIXEN 1980). DEN HOLLANDER et al. (1981) haben in Zellkulturüberständen von stimulierten humanen, lymphoiden Zellinien und von antigenstimulierten Meerschweinchenlymphozyten LIF-Aktivität mit einem Granulozytenpool von 20 Schweinen nachgewiesen. BELLINA u. SALERNO (1981) haben für den Nachweis von LIF in Zellkulturüberständen humaner Lymphozyten Leukozyten des Huhnes als Indikatorzellen ver-

wendet. Auch HOFFMAN et al. (1977)haben in Untersuchungen von Kulturüberständen menschlicher Lymphozyten mit Meerschweinchengranulozyten gezeigt, daß LIF nicht nur innerhalb einer Spezies wirksam ist. Nicht zuletzt zeigen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, daß Schweinegranulozyten durch im Serum von infizierten Rindern vorhandene Faktoren in ihrer Migration gehemmt bzw. stimuliert werden können.

Um die Ergebnisse der einzelnen Versuchsansätze direkt miteinander vergleichen zu können, muß nach einer Zielzelle gesucht werden, die auf ein und dasselbe mediatorhaltige Medium immer gleich reagiert. Zellen für alle Versuchsansätze immer von dem gleichen Tier zu gewinnen, war nicht möglich, da durch häufige Entnahmen größerer Blutmengen eine Veränderung des Blutbildes mit vermindertem Gehalt an allen reifen Blutzellen und vermehrtem Auftreten von Jugendformen zu erwarten ist. Es kann angenommen werden, daß Jugendformen im Migrationstest anders reagieren, als reife Zellen. Verschiedene Autoren haben festgestellt, daß sogar an verschiedenen Tagen gewonnene Granulozyten ein und desselben Individuums auf ein und dasselbe lymphokinhaltige Medium unterschiedlich reagierten (CLAUSEN 1971, DEN HOLLANDER et al. 1981). DEN HOLLANDER et al. (1981) haben diese Unterschiede darauf zurückgeführt,daß beim Ansetzen des Tests zeitliche Verschiebungen nicht ganz zu vermeiden sind und daß selbst bei gut

ausgewaschenen Granulozytenpräparationen damit gerechnet werden muß, daß in vivo vom Zelldonor gebildete Mediatoren an den granulozytären Rezeptoren haften bleiben, die dann im Migrationstest mit den im Testmedium enthaltenen Mediatoren interferieren. Auch die Verwendung von Meerschweinchenmakrophagen als Zielzellen erscheint problematisch, da für jeden Testansatz Makrophagen von einem anderen Meerschweinchen gewonnen werden müssen.

Erfolgversprechender, Zielzellen mit gleichbleibendem Reaktionsmuster für den Migrationstest zu erhalten, erschien hingegen die Möglichkeit, wie in der vorliegenden Arbeit, mehrere Zellpräparationen von verschiedenen Tieren zu poolen. Durch Verwendung gepoolter Granulozyten können individuelle Unterschiede im Reaktionsvermögen von Granulozyten einzelner Individuen auf Leukozytenmediatoren weitestgehend ausgeglichen werden. Falschnegative Ergebnisse durch Verwendung reaktionsgeschädigter Granulozyten einzelner Individuen, wie sie von CLAUSEN (1973) beobachtet wurden, können dadurch vermieden werden. Außerdem vermeidet man, daß für einzelne Tests zufällig Granulozytendonoren verwendet werden, deren Zellen individuell bedingt eine geringe Wanderungsfähigkeit besitzen (AGRUP et al. 1980, SALLINGER 1984). Eine Beurteilung speziell der Migrationshemmung ist bei Zellen solcher Individuen technisch kaum möglich.

DEN HOLLANDER et al. (1981) haben festgestellt, daß die aus dem LIF-Test gewonnenen Ergebnisse mit gepoolten Schweinegranulozyten besser reproduzierbar waren, als mit Granulozyten einzelner Schweine. Die gleiche Beobachtung haben sie auch mit gepoolten Meerschweinchenmakrophagen gemacht.

Die Verwendung einer reinen Granulozytenfraktion im Migrationshemmungstest bietet gegenüber einer lediglich durch einfache Sedimentation gewonnenen gemischten Leukozytensuspension den Vorteil, daß auch tatsächlich nur solche Substanzen in einem Testmaterial nachgewiesen werden, die die Migration von Granulozyten beeinflussen. AGRUP et al. (1980) haben in einem Migrationstestsystem mit nicht fraktionierten Leukozyten ohne Zusatz eines spezifischen Antigens eine Wanderungshemmung beobachtet, die der Anwesenheit kurzlebiger, lymphozytärer Suppressorzellen im Migrationssystem zugeschrieben wurde. Bei der Verwendung nicht fraktionierter Leukozyten ist außerdem eine Stimulierung der Lymphozyten durch Serumbestandteile nicht auszuschließen.

Für das Arbeiten mit einem Zellpool ist es andererseits besonders wichtig, darauf zu achten, daß die Granulozytenpräparation frei von Lymphozyten ist, da es sonst durch Unterschiede in den Histokompatibilitätsantigenen zur Stimulierung der Lymphozyten kommt, in deren Verlauf LIF oder LEF (Leukocyte Migration Enhancing Factor) gebildet werden können. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen

Granulozytenisolate bestanden zu 98 - 100% aus Granulozyten, der Rest aus mononukleären Zellen. DEN HOLLANDER et al. (1981) konnten in gepoolten Schweinegranulozytenkulturen mit gleicher Reinheit im Vergleich zu Granulozytenkulturen einzelner Schweine keine Mediatorenbildung in vitro feststellen. Auch CLAUSEN (1972) hat keine Hemmung bzw. Stimulierung der Wanderung gemischter Leukozyten von je zwei Testpersonen gegenüber der Wanderung der einzelnen Leukozytenpräparationen feststellen können. In der gemischten Kultur isolierter Lymphozyten kam es zur Bildung von LIF erst nach zwei Tagen Kulturdauer. Die Inkubationsdauer in der vorliegenden Arbeit betrug dagegen nur 18 Stunden. HOFFMAN et al. (1975), GLASSER u. FIEDERLEIN (1979) und CLAUSEN (1972) haben berichtet, daß für die Bildung von LIF in gemischten Leukozytenkulturen mindestens ein Anteil von 25% Lymphozyten erforderlich ist. Im Fall einer Lymphokinbildung in den mit Lymphozyten verunreinigten Granulozytenpräparationen durch Unterschiede in den Histokompatibilitätsantigenen ist bei gleichbleibendem Reinheitsgrad der einzelnen Zellarten zu erwarten, daß in einem Pool von 20 Schweinen die Höhe der Lymphokinbildung in allen Granulozytenpools immer gleich ist (LENHARD 1983). Der Einfluß neu gebildeter Substanzen auf den Migrationstest wäre immer der selbe,da diese neu gebildeten Substanzen dann auch in den Kontrollansätzen vorhanden sind.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Schweinegranulozyten liegt darin, daß Schweineblut für deren Isolierung jederzeit und in ausreichender Menge im Schlachthof für Routineuntersuchungen zur Verfügung steht. Schließlich lassen sich Schweinegranulozyten im Gegensatz zu Rindergranulozyten mit dem beschriebenen Verfahren leicht isolieren.

Zur Einhaltung einheitlicher Versuchsbedingungen muß auch darauf geachtet werden, daß für die Testansätze nicht unterschiedliche Materialien mit möglicherweise unterschiedlichem Gehalt an die Migration beeinflussenden Faktoren verwendet werden. Da sich alle Organismen ständig mit Antigenen aus ihrer Umwelt auseinandersetzen, muß man damit rechnen, daß prinzipiell Serum jeglicher Herkunft Substanzen enthalten kann, die die Migration von Zellen hemmen oder stimulieren. Verschiedene Serumchargen als Zusatz zum Testmedium können deshalb ein Testergebnis unterschiedlich beeinflussen (BERGSTRAND 1979). Untersuchungen von FOX (1974) zeigen zum Beispiel, daß MIF (Migration Inhibitory Factor) sogar in fetalem Kälberserum vorkommt. MIF-Aktivität wurde in den Untersuchungen von FOX nicht in allen Serumchargen gefunden. CLAUSEN (1971) hat in Migrationshemmungstests mit humanen Leukozyten mit zwei Zellkulturmedien der gleichen Zusammensetzung aber von zwei verschiedenen Firmen unterschiedliche Migrationshöfe beobachtet. In allen vorliegenden Untersuchungen wurde deshalb aus-

schließlich RPMI-1640-Medium und Kaninchenserum jeweils der selben Charge verwendet. Es kann darum davon ausgegangen werden, daß der Einfluß eventuell vorhandener Stoffe mit hemmender bzw. stimulierender Wirkung auf die Zellmigration in allen Testansätzen immer der gleiche war.

Aus dem selben Grund wurde auch darauf geachtet, daß die Ausgangsmaterialien schon vor Testbeginn immer gleich behandelt wurden. Insbesondere wurden die Kulturmedien und das Kaninchenserum für alle Testansätze gleich oft aufgetaut bzw. tiefgefroren. Die zu prüfenden Rinderseren wurden nur einmal aufgetaut. BAER et al. (1978) haben berichtet, daß es durch wiederholtes Eingefrieren und Auftauen von Seren mit Hemmaktivität auf die Migration von Makrophagen zum Verlust dieser Hemmaktivität kam.

In Vorversuchen bildeten Schweinegranulozyten in Gegenwart von Kaninchenserum der verwendeten Charge Migrationshöfe, die im Aufbau den in der Literatur beschriebenen entsprachen. Schwierigkeiten ergaben sich allerdings nach Zusatz der zu prüfenden Rinderseren zum Medium insofern, als in Vorversuchen zunächst so gut wie keine Zellen aus dem Agarosetropfen auswanderten. Diese Beobachtung wurde mit Seren von Schlachtrindern bestätigt. Ursache dieser unspezifischen Hemmung der Wanderung von Granulozyten waren Verschiebungen des pH-Wertes in den Bereich um 7,8 , die sich nach Zugabe der Seren zum fertigen Medium einstellten.

FAHLBUSCH u. DORNBERGER (1979) wiesen darauf hin, daß bei pH-Werten außerhalb des Normalbereiches von 7,2 - 7,4 die Zellen in der gleichen Zeit erheblich weniger weit wanderten und außerdem der Migrationsindex sich signifikant änderte. Auch FEDERLIN et al. (1971) empfahlen, den pH-Wert für den Migrationstest unbedingt in einem Bereich zwischen 7,2 und 7,4 einzustellen. In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Problem durch Erhöhung der Pufferkapazität auf 31,25 mMol HEPES/l Medium und Einstellen des pH-Wertes auf 7,25 gelöst werden. Nach Zugabe von 100 µl Rinderserum zu 400 µl Medium betrug die Konzentration von HEPES im Testmedium 25 mMol/l; der pH-Wert stellte sich auf Werte zwischen 7,3 und 7,4 ein. Diese HEPES-Konzentration ist für Zellen nicht toxisch und ein Absinken des pH-Wertes unter 7,2 durch metabolische Azidose war bei 18-stündiger Inkubationsdauer nicht zu erwarten. Ein gleichbleibender pH-Wert in allen Versuchsansätzen und während der gesamten Versuchsdauer war damit gewährleistet.

Die optimale Serumkonzentration von 20% für die Wanderung der Schweinegranulozyten wurde ebenfalls in Vorversuchen ermittelt. Bei unter oder über 20% liegenden Serumkonzentrationen war die von den Granulozyten durchwanderte Strecke und die Zelldichte der Migrationshöfe erheblich geringer. Eine Serumkonzentration von 20% wurde auch von GUTEKUNST (1979)im direkten Migrationshemmungstest mit Schweineleukozyten als optimal angesehen. Diese Konzentration entsprach

zugleich derjenigen, in der andere Autoren ihre LIF- bzw. MIF-haltigen Seren im Migrationshemmungstest einsetzten (YAMAMOTO u. TAKAHASHI 1971, RUSCETTI et al. 1976, COCHRAN et al. 1976, NETA u. SALVIN 1980). Die in der vorliegenden Arbeit zu prüfenden Rinderseren dienten also zugleich als Proteinkomponente für die Granulozytenzellkultur.

Schweinegranulozyten bildeten in Gegenwart von Rinderseren nach 18-stündiger Bebrütung Migrationshöfe, die nicht ganz den in der Literatur beschriebenen entsprachen. Nach JOKIPII u. JOKIPII (1974) und WATANUKI u. HAGA (1977) besteht ein Migrationshof aus einem inneren zelldichten Hof, einem äußeren Hof aus nicht zusammenhängenden Zellen in einer Schicht und verstreut außerhalb des eigentlichen Hofes liegenden Zellen. In dem in dieser Arbeit verwendeten Testsystem mit Rinderseren, in dem zwar nicht Makrophagen sondern Granulozyten als Zielzellen verwendet wurden, wurde ein innerer, dichter Hof nicht regelmäßig festgestellt. Die Messungen wurden deshalb in Anlehnung an die Methode von JOKIPII u. JOKIPII grundsätzlich an der äußeren Begrenzung des Migrationshofes vorgenommen.

Versuche, die Migrationshöfe direkt auf Papier zu projizieren und zu planimetrieren scheiterten am unzureichenden Kontrast der ausgewanderten Zellen. Auf die gleichen Schwierigkeiten mit Granulozyten haben FENTON u. TAYLOR (1975) hingewiesen. Die Messungen mußten daher mit einer Mikrometereinrichtung im Phasenkontrastmikroskop vorgenom-

men werden. Nach WATANUKI u. HAGA (1977) liefert die Auswertung von Migrationshemmungstests in Form von stichprobenartigen Längenmessungen mit planimetrischen Verfahren mindestens vergleichbare Ergebnisse, wenn die Anordnung der Meßrichtungen immer die gleiche ist.

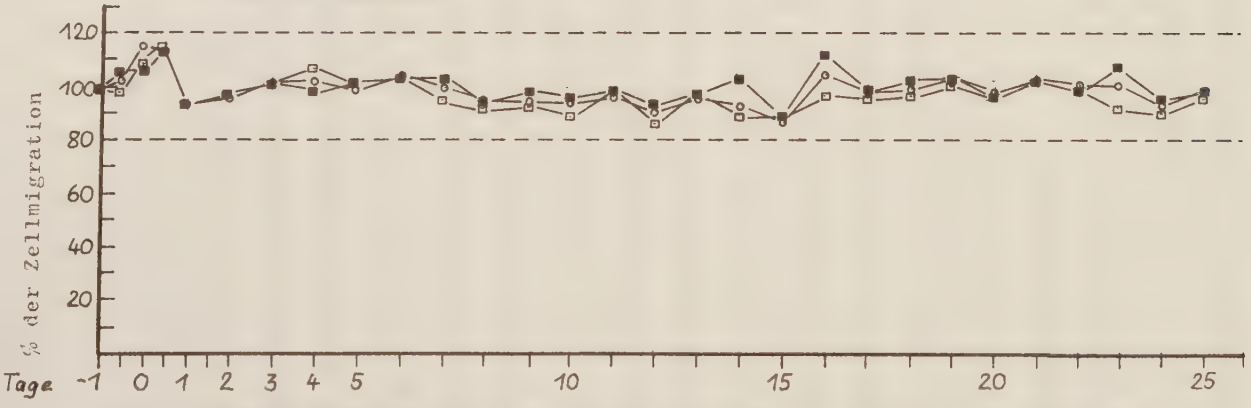
Durch den langwierigen, bis zu vier Stunden dauernden Ablesevorgang waren zeitliche Verzögerungen zwischen dem Abschluß der Zellmigration und dem Zeitpunkt des Ablesens unvermeidbar. Während der Untersuchungen des öfteren wiederholte Messungen sofort nach Kühlung und vier Stunden danach ergaben jedoch keine Unterschiede in der von den Zellen durchwanderten Strecke, wenn die Testplatten während dieser Zeit bei Zimmertemparatur aufbewahrt wurden.

Im allgemeinen wird der Migrationsindex als Maß der Aktivität migrationshemmender Substanzen angesehen (CLAUSEN 1973, BENDTZEN 1976, HOFFMAN et al. 1977, AGRUP et al. 1980, CARUSO u. BELLINA 1983). Bei der Beurteilung der gewonnenen Ergebnisse muß man sich dennoch im klaren darüber sein, daß der Wert des ermittelten Migrationsindex nicht unbedingt eine Aussage über den tatsächlichen Gehalt an Hemm- bzw. Stimulationsfaktoren im Serum zuläßt. Um hierüber genauere Angaben machen zu können, wird heute empfohlen, das Testmaterial auszutitrieren und die Aktivität des Materials in Titerstufen anzugeben (CHESS et al. 1975, RUSCETTI et a. 1976, NETA et al. 1981, FALBUSCH (persönl. Mitt. 1982)) oder besondere Testanordnungen zur Ermittlung

der Aktivität biologischer Substanzen wie den 4- oder 6-Point-Parallel -Line-Assay (FENTON u.TAYLOR 1975, DEN HOLLANDER et al. 1981) unter Einbeziehung eines Laborstandards anzuwenden. In der vorliegenden Arbeit kann daher eine Aussage nur darüber gemacht werden, ob das jeweilige Serum in der eingesetzten Verdünnung von 1:5 eine hemmende oder stimulierende Aktivität für die Migration von Granulozyten enthielt oder nicht.

Die Reproduzierbarkeit der mit der beschriebenen Methode gewonnenen Ergebnisse unter identischen Testbedingungen kann an den einzelnen, aus parallelen Ansätzen ermittelten Migrationsindices abgelesen werden. In Abbildung 22 sind die Migrationsindices wiedergegeben, die aus den Migrationshöfen mit dem größten bzw. kleinsten Durchmesser, sowie aus den Durchschnittswerten aller vier parallel angesetzter Migrationshöfe errechnet wurden. Das Ansetzen von vier Agarosetropfen mit jedem zu prüfenden Serum hat den Vorteil, daß Abweichungen einzelner Migrationshöfe vom Durchschnitt ausgeglichen werden können. Auffallend abweichende Einzelergebnisse und aus technischen Gründen nicht ablesbare Migrationshöfe können von der Beurteilung ausgeschlossen werden. Die Reproduzierbarkeit der mit dem eingesetzten Verfahren gewonnenen Ergebnisse konnte in wiederholt durchgeführten Untersuchungen besonders auffallender Ergebnisse, wie z.B. der völligen Hemmung der Migration nach Berenil-Behandlung bei dem Tier D2, bestätigt werden.

Abb.22: Migrationskurvenverlauf parallel angesetzter Versuche unter identischen Testbedingungen



■——■ Migrationswerte, die aus den größten Migrationshöfen eines Testansatzes errechnet wurden

□——□ Migrationswerte, die aus den kleinsten Migrationshöfen eines Testansatzes errechnet wurden

○——○ Migrationswerte, die aus dem Durchschnitt aller vier parallel angesetzter Migrationshöfe eines Testansatzes errechnet wurden

5.2 Besprechung der Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse der Hemmungsaktivität von Seren der mit Trypanosomen infizierten Rinder zeigen, daß zwischen der Infektion der Versuchsrinder mit Trypanosomen und dem Auftreten von Faktoren mit hemmender bzw. stimulierender Wirkung auf die Wanderung von Granulozyten im Serum dieser Rinder ein ursächlicher Zusammenhang besteht. Mit Seren aller 15 mit Trypanosomen infizierten Rinder konnte im verwendeten Testsystem ein vom Normalbereich abweichender Migrationsindex beobachtet werden. Dagegen weisen die Seren von drei der fünf nicht infizierten Kontrollrinder keine Abweichung des Migrationsindex vom Normalbereich auf.Bei dem einen der beiden Kontrolltiere(F3,Abb.11), deren Seren eine vom Normalbereich abweichende Migration der Schweinegranulozyten bewirkten, wurde im fraglichen Zeitraum eine Bronchopneumonie, verbunden mit erhöhter Körpertemperatur, festgestellt. Bei dem anderen Kontrolltier mit abnormen Migrationswerten (D9/3.Versuchsreihe Abb.16) wurde auf Grund klinischer Parameter ebenfalls auf eine Erkrankung wahrscheinlich infektiösen Charakters rückgeschlossen. Die im Serum der infizierten Rinder und zweier nicht infizierter Rinder nachgewiesenen die Migration von Granulozyten beeinflussenden Faktoren können deshalb nicht als spezifisch für die Trypanosomeninfektion angesehen werden, sondern es kommt auch im Verlauf anderer infektiöser Er-

krankungen zur Bildung solcher Stoffe. Diese Feststellung steht im Einklang mit allgemein gültigen Mechanismen bei der zellulären Immunreaktion. Danach müssen im Verlauf der zellulären Abwehr grundsätzlich zwei Vorgänge unterschieden werden. In der ersten Phase kommt es zur Erkennung des spezifischen Antigens durch die Lymphozyten, die unter anderem mit der Bildung und Ausscheidung von Lymphokinen reagieren. Die Lymphokine wirken dann unabhängig von der Art des verursachenden Antigens immer gleich auf ihre Zielzellen, sind also bezüglich des Antigens unspezifisch (FEDERLIN et al. 1971, FASSAS u. BRULEY-ROSSET 1979, BENDTZEN u. BENDIXEN 1980).

Das infizierte Tier S3 aus der 1.Versuchsreihe war am Anfang des Versuchs ebenfalls an einer klinisch manifesten Bronchopneumonie erkrankt und man muß damit rechnen, daß auch bei diesem Tier im Verlauf dieser Infektion Stoffe mit hemmender bzw. stimulierender Wirkung auf die Granulozytenmigration gebildet wurden, die mit den durch die Trypanosomeninfektion gebildeten Stoffen im Migrationstest interferierten. Prinzipiell muß mit solchen Überlagerungen bei allen mit Trypanosomen infizierten Rindern gerechnet werden, da die in allen drei Versuchsreihen beobachteten Infektionen oder auch sonstige interkurrente Infektionen bei diesen Tieren auch klinisch inapparent verlaufen sein können. Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, warum die Verlaufskurven der Migrationswerte bei den einzelnen Tieren

trotz teilweise ähnlichem Parasitämieverlauf so unterschiedlich ausfielen.

Hinzu kommt, daß die Migration der Granulozyten, außer durch Lymphozytenmediatoren noch durch eine Reihe weiterer Faktoren beeinflußt werden kann (BENDTZEN u. BENDIXEN 1980). Soweit diese Faktoren das Testsystem betreffen, wie Temperatur, pH-Wert, Zeitablauf bei der Isolierung der Granulozyten usw. wurden diese, wie oben beschrieben, soweit möglich standardisiert. Es ist jedoch anzunehmen, daß einige weitere solcher Faktoren in den untersuchten Rinderseren enthalten waren und daß die Serumspiegel dieser Faktoren im Beobachtungszeitraum teils physiologischen, teils auch durch die Trypanosomeninfektion verursachten Schwankungen unterlagen, wodurch auch die Migration der Zielzellen in unterschiedlichem Maß beeinflußt worden sein kann.

Hier wäre einmal an die Wirkung toxischer Substanzen und Zerfallsprodukte der Trypanosomen zu denken.

Es ist selbstverständlich, daß auch durch die Wirkung bestimmter Antikörper, die in den zu prüfenden Seren vorhanden sein können, die Migration der Zielzellen gehemmt werden kann. Hierfür kommen in erster Linie zytotoxische Antikörper in Frage (FLANAGAN et al.1973, BAER et al.1978). In einigen Stichproben wurden Seren, die eine Hemmung der Migration der Zielzellen bewirkten, auf den Gehalt an

zytotoxischen Antikörpern geprüft. Da Granulozyten als Zielzellen im Zytotoxizitätstest wegen mangelnder Reproduzierbarkeit weniger geeignet sind, und Lymphozyten ein ähnliches Antigenmuster aufweisen wie die Granulozyten, wurden im Zytotoxizitätstest die Lymphozyten von 20 Schlachtschweinen untersucht. In keinem Fall konnte mit Seren, die die Migration von Schweinegranulozyten hemmten, eine Reaktion im Zytotoxizitätstest mit Schweinelymphozyten ermittelt werden. Eine Beteiligung solcher zytotoxischer Antikörper bei der Migrationshemmung durch die in der vorliegenden Arbeit zu prüfenden Seren wird deshalb ausgeschlossen.

Bei der Verwendung von Zellen des Schweines zur Prüfung von Rinderseren muß auch das J-Blutgruppensystem des Rindes beachtet werden. Rinder, die das Blutgruppenantigen J, das sowohl an Zellen gebunden, als auch in löslicher Form im Serum vorkommen kann, nicht besitzen, können im Serum gegen dieses Blutgruppenantigen gerichtete natürliche zytotoxische bzw. hämolysierende Antikörper besitzen. Das Blutgruppenantigen A des Schweines ist mit dem Blutgruppenantigen J des Rindes serologisch sehr nahe verwandt. Natürliche, gegen das J-Blutgruppenantigen des Rindes gerichtete Antikörper reagieren deshalb auch mit Schweinezellen, die das Blutgruppenantigen A tragen. Eine Auswahl an Seren von Rindern, die im Migrationstest Hemmungen verursachten und die bei der Untersuchung der Blutgruppen J-negativ waren, wurden deshalb im Hämolysetest mit

Schweineerythrozyten auf ihren Gehalt an Anti-J-Antikörpern überprüft. In keinem Fall konnten im Serum J-negativer Rinder J-Antikörper nachgewiesen werden. Daraus wird geschlossen, daß auch natürliche J-Antikörper in den vorliegenden Untersuchungen keinen Einfluß auf die beobachteten Migrationshemmungen hatten.

Die Wirkung von Blutgruppen-Isoantikörpern, wie sie von BENDIXEN u. SOBORG (1969) und FASSAS et al. (1979) zu bedenken gegeben wurde, kann in der vorliegenden Arbeit bei Verwendung heterologer Seren ausgeschlossen werden.

Die starke Hemmung der Granulozytenmigration ab dem 11.Tag bei dem mit T.brucei infizierten Rind D7 aus der 3.Versuchsreihe (Abb.20) wird antispeziesspezifischen, agglutinierenden Antikörpern zugeschrieben. Die charakteristische Agglutination der Granulozyten wurde in wiederholt durchgeführten Migrationsversuchen mit unterschiedlichen Schweinegranulozytenpools an verschiedenen Tagen bestätigt. Außerdem agglutinierten diese Seren auch die Erythrozyten von Schweinen bis zu einer Verdünnung von 1:4. Die Tatsache, daß die Agglutinationen mit Seren ab dem 11.Infektionstag und von da an konstant auftraten, spricht dafür, daß die Bildung dieser heterologen, gegen Schweinegranulozyten und Schweineerythrozyten gerichteten Antikörper durch die Trypanosomeninfektion induziert wurde. Wie es zur Bildung dieser Antikörper kommt, ist noch unbekannt. Einmal

besteht die Möglichkeit einer Antigenverwandtschaft zwischen den für das Schwein bzw. andere Tierarten speziesspezifischen Antigenen und trypanosomalen Antigenen. Wahrscheinlich entstehen diese heterophilen Antikörper aber neben anderen für die Trypanosomen unspezifischen Antikörpern durch eine polyklonale, unspezifische Aktivierung von B-Lymphozyten durch ein trypanosomales Mitogen (ASSOKU u. TIZARD 1978). Das Auftreten heterophiler, hämagglutinierender Antikörper wurde auch von HOUBA et al. (1969) während einer experimentellen Infektion mit Trypanosomen bei Affen sowie beim Menschen in 62% der Fälle von Trypanosomiasis beschrieben. Auch MURRAY et al. (1974) und MORRISON et al. (1978) haben über das Vorkommen von heterophilen Antikörpern im Serum von Mäusen nach einer Infektion mit T.congolense bzw. T.brucei berichtet.

SOBORG u. BENDIXEN (1967), GAINES et al. (1972) und ROCKLIN (1974) berichten noch über eine weitere Möglichkeit der Wanderungshemmung von Granulozyten. Ausgehend von der Beobachtung, daß in bestimmten Systemen die Wanderung nur nach Zusatz von Granulozyten von spezifisch sensibilisierten Tieren gehemmt wurde, schließt ROCKLIN auf das Vorhandensein spezifischer zytophiler Antikörper auf der Zelloberfläche dieser Granulozyten, die dann nach Interaktion mit dem spezifischen Antigen die Hemmung der Wanderung verursachen. HOFFMAN et al. (1975) vertreten dagegen die Meinung,daß zumindest in ihrem Testsystem zytophile Anti-

körper bei der Migrationshemmung von neutrophilen Granulozyten keine Rolle spielten.

WORONICK et al. (1981) haben gezeigt, daß IgG und IgA, sowie Fc-Fragmente von IgG, nicht jedoch IgM die Migration von Granulozyten hemmten. Die Migrationshemmung mit IgG konnte sowohl bei autologen als auch homologen Granulozyten beobachtet werden. Die selbst bei kommerziellem IgG gefundene Hemmaktivität konnte nicht spezifischen Antikörpern wie zytotoxischen oder leukoagglutinierenden Antikörpern zugeschrieben werden, sondern wurde als eine den IgG- und IgA-Molekülen eigene Aktivität ganz allgemein definiert.

Weiterhin wird über eine Beteiligung von Immunkomplexen bei der Hemmung der Granulozytenmigration berichtet (FEDERLIN et al. 1971, COCHRAN et al. 1976, BERTOTTO et al. 1981). Dagegen sind HOFFMAN et al. (1975) auf Grund ihrer Untersuchungen der Meinung, daß Immunkomplexe die Migration von Granulozyten nicht hemmen. Ihr Testsystem unterscheidet sich jedoch wesentlich von dem anderer Autoren, die das Gegenteil gefunden haben. Insbesondere ist ein dauernder Kontakt mit den Immunkomplexen über die gesamte Migrationsdauer im Testsystem von HOFFMAN et al.(1975) nicht gegeben, wie er von KOTKES u. PICK (1975) zur Ausbildung einer Migrationshemmung durch Immunkomplexe als notwendig erachtet wurde. KOTKES u. PICK vermuten, daß die Immunkomplexe über Fc-Rezeptoren an die Zelloberfläche gebunden werden und dadurch die Wirkung eines Migration-Promoting-

Factors aus dem Serum verhindern. Über das Vorkommen eines Migration-Promoting-Factors im Serum, der die Migration der Granulozyten überhaupt erst ermöglicht, haben auch BRYANT et al. (1966) berichtet. Daß Immunkomplexe bei der Trypanosomeninfektion und damit auch in den in der vorliegenden Arbeit zu testenden Rinderseren vorkommen, ist sehr wahrscheinlich. Es ist möglich, daß variantenspezifische Antigene absterbender Trypanosomen mit dem entsprechenden Antikörper und Komplement Immunkomplexe bilden, die dann die Migrationshemmungen der Granulozyten verursachen. Immunkomplexe sind indirekt bei Infektionen mit T.congolense und T.vivax nachgewiesen worden (VALLI u. FORSBERG 1976, VAN DEN INGH 1976). Wahrscheinlich spielen sie bei der Pathogenese der Trypanosomiasis eine bedeutsame Rolle (MANSFIELD u. KREIER 1972).

BRYANT et al. (1966) haben eine durch Phagozytoseaktivität der Granulozyten bedingte Hemmung der Migration beobachtet, unabhängig davon, welche Partikel phagozytiert wurden. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wäre eine solche unspezifische Hemmung der als Zielzellen verwendeten Schweinegranulozyten durch Phagozytose von Immunkomplexen aus trypanosomalen Antigenen und gegen sie gerichteten Antikörpern möglich. Mit der von BRYANT et al. (1966) beobachteten Migrationshemmung durch Phagozytose war eine Aggregation der Granulozyten verknüpft. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Aggregationen der Granulozyten verbundene Migrationshemmungen bei dem Tier D5 in der 3.Versuchsreihe an

den Tagen 7, 10 und 16 beobachtet (Abb.18). Möglicherweise handelt es sich bei diesen Hemmungen um solche der von BRYANT beschriebenen Art.

Von GAINES et al. (1972) und FASSAS et al.(1979) wird die Möglichkeit der Beteiligung von chemotaktischen Faktoren bei der Migrationshemmung diskutiert. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit dürften diese Faktoren als Hemmfaktoren jedoch keine Rolle gespielt haben, da sie nur dann auf die Migration von Granulozyten wirken, wenn für sie ein Konzentrationsgefälle besteht. In den vorliegenden Untersuchungen könnte eine Migrationshemmung nur durch einen erhöhten Gehalt an chemotaktischen Faktoren im Agarosetropfen bedingt werden, die die Zellen dann am Auswandern aus dem Agarosetropfen hindern würden. Da die Ausgangsmaterialien für die Agarosezellsuspension aber immer die gleichen waren, müßte deshalb auch die Hemmung der Zellmigration in allen Testansätzen immer gleich gewesen sein. Eine de-novo-Synthese von Chemotaktischem Faktor in der Zellsuspension, wie sie von GAINES vermutet wurde, ist in dem Migrationstest der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen, da im System keine Lymphozyten dafür vorhanden waren. Denkbar wäre jedoch eine verstärkte Auswanderung der Zellen aus dem Agarosetropfen durch im Rinderserum vorhandene chemotaktische Substanzen. Als solche kämen Komplementfaktoren des Serums in Frage, die durch die Agarose der Zellsuspension aktiviert worden sein könnten (GLASSER u. FIEDERLEIN 1979, GRAY et al. 1982)

oder ein von aktivierten Lymphozyten in vivo im Verlauf einer zellulären Immunreaktion gebildeter Chemotaktischer Faktor.

Neuerdings wird über einen möglichen gemeinsamen Wirkungsmechanismus des LIF und MIF Faktors diskutiert (BERGSTRAND 1979). Demnach kommt es durch die Stimulierung von Granulozyten mit Faktoren aus Überständen stimulierter Lymphozyten zur Bildung eines Plasminogen-aktivierenden Faktors sowie zur Ausschüttung von Elastasen und Kollagenasen, die ihrerseits nicht näher definierte Serumbestandteile spalten. Erst diese Spaltprodukte sollen dann die eigentliche Migrationshemmung verursachen (BENDTZEN 1976). Da Granulozyten und Monozyten auch anderweitig zur Ausschüttung solcher Proteasen gebracht werden können, ist eine immunologisch unspezifische Hemmung der Migration durch in der Folge im Serum auftretende Spaltprodukte nicht auszuschließen.

Von welchen der oben angeführten Faktoren oder Mechanismen die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Hemmungen bzw. Stimulationen der Migration von Schweinegranulozyten verursacht wurden, kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden. Wahrscheinlich wird aber in den gemessenen Migrationsindices die Summe der Effekte mehrerer verschiedener Faktoren erfaßt. Es darf jedoch als sicher angenommen werden, daß die in vivo von aktivierten Lymphozyten gebildeten Lymphokine LIF und LEF an der Regulation der Granulo-

zytenmigration beteiligt sind. Vermutlich wird durch die Wirkung all dieser hemmenden bzw. stimulierenden Faktoren die Granulozytenmigration in vivo reguliert und genau abgestimmt. Ob es sich hierbei um eine einfache Summation der Effekte einzelner Faktoren handelt oder ob die Wirkung der einzelnen Faktoren durch andere sonstwie moduliert wird, ist nicht bekannt. Sicher wird jedoch die Granulozytenmigration durch die beschriebenen Faktoren in einer für die Funktion der Granulozyten als Effektorzellen der jeweiligen momentanen Situation angemessenen Weise optimal reguliert. Gesunde Tiere würden sich dann in einem Zustand der Homöostase befinden, wie sie in den Migrationskurven der Kontrollrinder D4, S4 und K3 zum Ausdruck kommt (Abb. 2, 3 u. 10). Bei antigener Belastung kann es dagegen zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen hemmenden und stimulierenden Faktoren in der einen oder anderen Richtung kommen, wie es bei den infizierten Tieren der Fall war. Dabei ist nicht ausgeschlossen, daß zeitweise ein Zustand der Homöostase gemessen wird, obwohl die tatsächlichen Serumspiegel einzelner Faktoren erhöht sind, solange nur hemmende und stimulierende Faktoren sich gegenseitig im Gleichgewicht halten. Diese Auffassung deckt sich mit der Vermutung einiger anderer Untersucher (SOBORG u. BENDIXEN 1967, FEDERLIN et al. 1971, BERGSTRAND 1979, WORONICK et al. 1981).

Über die biologische Bedeutung der in vivo gemessenen LIF-Aktivität bestehen unterschiedliche Meinungen. Während BOTTO et al. (1977), FASSAS et al. (1979) und FASSAS und

BRULEY-ROSSET (1979) die Ansicht vertreten, daß in vivo nachgewiesenes LIF oder LEF einen Status der zellulären Immunkompetenz anzeigt, glauben BERTOTTO et al. (1980, 1981) und PETRINI et al. (1982), daß es sich bei Serum-LIF um einen immunsuppressiven Faktor handelt. Vermutlich ist die unterschiedliche Beurteilung der Bedeutung der im Serum nachgewiesenen LIF-Aktivität durch die zitierten Autoren ebenfalls vor dem Hintergrund der Überlegung zu sehen, daß nicht nur ein LIF-Faktor sondern noch weitere Faktoren die Migration von Granulozyten stimmulierend oder hemmend beeinflussen, die bei verschiedenen Krankheiten und in unterschiedlichen Krankheitsstadien in unterschiedlicher Konzentration und Zusammensetzung auftreten und zudem noch durch weitere interkurrente Erkrankungen beeinflußt sein können. LIF-Aktivität konnte in den zitierten Untersuchungen und in den Untersuchungen von COCHRAN et al. (1976) zudem jeweils nur bei einem Teil der Erkrankten aber auch bei einem Teil der gesunden Kontrollpersonen ermittelt werden. Der Anteil LIF-positiver Patienten war aber in beiden Gruppen jeweils signifikant unterschiedlich, ähnlich wie bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. Auf der Grundlage dieser Überlegungen müssen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen in Bezug darauf, ob durch die gemessenen Migrationsindices Rückschlüsse auf den jeweiligen Status des zellulären Immunsystems gezogen werden können, äußerst vorsichtig beurteilt werden.

Der Verlauf der Migrationskurven war bei den einzelnen infizierten Tieren so unterschiedlich, daß eine Bildung von Gruppen mit ähnlichem Reaktionsmuster nicht möglich war. Es muß festgestellt werden, daß alle Rinder auf die Infektion mit T.congolense bzw. T.brucei ganz individuell mit der Bildung hemmender bzw. stimulierender Faktoren für die Granulozytenmigration im Serum reagierten. Es wurde weiter oben gesagt, daß die Verlaufskurven der Granulozytenmigration durch interkurrente Infektionen beeinflußt sein können. Ein Vergleich der beiden Kontrollrinder der 2.Versuchsreihe zeigt aber, daß interkurrente Infektionen nicht zwangsläufig gleichzeitig in allen Versuchsrindern einer Versuchsreihe auftreten müssen. Während die Migrationskurve des an einer Bronchopneumonie erkrankten Kontrollrindes F3 (Abb.11) in den ersten 14 Tagen des Beobachtungszeitraumes wiederholt Stimulationen der Granulozytenwanderung aufweist,gibt der ausgeglichene Verlauf der Migrationskurve des Kontrolltieres K3 (Abb.10) im Normbereich keine Hinweise auf eine möglicherweise klinisch unerkannt gebliebene interkurrente Infektion bei diesem Tier. Eine Korrektur der Migrationskurven von mit Trypanosomen infizierten Versuchsrindern nach dem Verlauf der Migrationskurve der Kontrollrinder erscheint deshalb nicht angebracht.

Betrachtet man in der ersten Versuchsreihe die beiden reinfizierten Tiere D1 (Abb.6) und S1 (Abb.8) vergleichend miteinander, so fällt auf, daß der Verlauf der Migrationskurve bei dem Tier D1 bei relativ niedrigen Parasitenzahlen

ziemlich ausgeglichen ist, während bei dem Tier S1 mit zwei hohen Parasitämiegipfeln die Migrationskurve teilweise stark vom Normalbereich abweicht. Dies würde darauf hindeuten, daß Tiere, die die Parasitämie besser begrenzen können, geringeren Störungen der Homöostase zwischen den die Migration beeinflussenden Faktoren unterworfen sind. Da die an der Regulation der Granulozytenmigration beteiligten Faktoren zum Großteil aus dem zellulären und auch humoralen Immunsystem abgeleitet werden können, könnte man daraus auf eine Stabilität in der Funktion des gesamten Immunsystems bei diesen Tieren schließen.

Diese Hypothese würde auch auf das ebenfalls reinfizierte Rind D2 (Abb.7) zutreffen, das sich bezüglich Parasitämie und Migrationsindexkurve ähnlich wie das Tier D1 verhielt. Dagegen zeigte das Tier S2 (Abb.9) ab dem 14.Infektionstag wie das Tier S1 starke Abweichungen der Migrationsindexkurve aus dem Normalbereich, obwohl der Parasitämieverlauf eher demjenigen der reinfizierten Dahomey-Rinder entsprach. Dieses Rind litt an einer schweren, progressiven Anämie, die zu einer spezifischen Behandlung zwang. Die Anämie bei der Trypanosomiasis wird als Maß für die Schwere der Erkrankung angesehen. Als Entstehungsmechanismus für die durch eine Trypanosomeninfektion bedingte Anämie werden Autoimmunreaktionen diskutiert (Mac KENZIE u. CRUICKSHANK 1973). Daß bei Trypanosomeninfektionen Antikörper vorkommen, die gegen normale, körpereigene Gewebsantigene gerichtet sind, ist bekannt. Es darf angenommen

werden, daß Störungen im zellulären Immunsystem zur Bildung von Autoimmunantikörpern führen. Es ist deshalb nicht auszuschließen, daß die bei dem Rind S2 beobachtete Störung der Homöostase zwischen hemmenden und stimulierenden Faktoren für die Granulozytenmigration mit der starken Anämie dieses Tieres in einem direkten Zusammenhang steht.

Die vollständige Hemmung der Granulozytenmigration mit Seren des Rindes D2 an den Tagen 52 und 57 nach der Infektion wird auf Einflüsse der Behandlung mit Berenil ^{R} am Tag 43 zurückgeführt. Auch mit den entsprechenden Seren des Rindes S2 war die Granulozytenmigration, wenn auch nicht vollständig, so doch deutlich gehemmt. Ob diese Hemmungen durch einen direkten Einfluß des Berenil^{R} auf die Granulozyten bedingt ist oder ob Berenil möglicherweise eine immunmodulierende Wirkung besitzt, ist noch unbekannt. Da es durch die Wirkung von Berenil^{R} zu einer Destabilisierung der trypanosomalen Membranen und zur Zerstörung der Trypanosomen kommt, besteht die Möglichkeit, daß durch massive Freisetzung trypanosomaler Antigene oder Mitogene Lymphozyten aktiviert und zur Bildung von LIF stimuliert wurden. Über eine Aktivierung von Lymphozyten verschiedener Spezies einschließlich solcher des Rindes durch trypanosomale, mitogen wirkende Substanzen haben MANSFIELD et al. (1976), GREENWOOD u. ODULOJU (1978), EMERY et al. (1980) und SELKIRK et al. (1981) berichtet. Die Hemmungen der Migration nach der Behandlung der beiden Tiere können aber ebensogut durch Bildung

von Immunkomplexen aus im Serum vorhandenen Antikörpern und freigewordenen Trypanosomenantigenen bedingt sein. Eine Schädigung der Granulozyten dieser Rinder durch toxische Wirkungen von Berenil^{R} oder von freigesetzten möglicherweise toxisch wirkenden trypanosomalen Substanzen konnte in den Blutausstrichpräparaten nicht festgestellt werden.

Im Vergleich zu den reinfizierten Dahomey-Rindern D1 und D2 war die Migrationskurve bei dem erstmals mit Trypanosomen infizierten Rind D3 (Abb.4) weniger ausgeglichen, obwohl es die Höhe der Parasitämie gut zu begrenzen vermochte. Die Unterschiede in der Ausgeglichenheit der Migrationskurven zwischen erst- und reinfizierten Dahomey-Rindern dieserVersuchsreihe lassen vermuten, daß eine Konditionierung des Immunsystems nach einer vorangegangenen Erstinfektion mit Trypanosomen erfolgt und die Resistenz gegenüber dem verwendeten Trypanosomenstamm dadurch erhöht wird.

Die Unterschiede in der Ausgeglichenheit des Migrationskurvenverlaufs zwischen den reinfizierten Schwarzbunten und Dahomey-Rindern können zwischen den beiden erstinfizierten Rindern dieser Versuchsreihe S3 (Abb.5) und D3 (Abb.4) nicht bestätigt werden, obwohl beide sich im Parasitämieverlauf deutlich unterschieden. Das erstinfizierte Deutsche Schwarzbunte Rind zeigt im Beobachtungszeitraum zwei hohe Parasitämieschübe, wogegen der Para-

sitämieverlauf bei dem Dahomey-Rind nach einem hohen, ersten Gipfel durch sinkende Parasitenzahlen gekennzeichnet ist.

Für die erstinfizierten Rinder der 2.Versuchsreihe konnte ein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit der Tiere zur Begrenzung der Parasitämie und einem ausgeglichenen Verlauf der Migrationskurve ebenfalls nicht hergestellt werden. Zwei dieser Tiere F2 (Abb.13) und K1 (Abb.14) konnten die Parasitämie begrenzen, während die beiden anderen Rinder F1 (Abb.12) und K2 (Abb.15) voll empfänglich für die Trypanosomeninfektion waren. Zwar wurde mit Seren des Rindes F2 ein im großen und ganzen ausgeglichener Verlauf der Migrationskurve beobachtet. Mit Seren des Rindes K1 war jedoch genau das Gegenteil der Fall. Die Migrationskurve wies bei diesem Tier über weite Strecken Hemmungen der Migration auf. Bei den voll empfänglichen Rindern (F1 u. K2) dieser Versuchsreihe traten im Verlauf der Migrationskurven ebenfalls Unterschiede auf, obwohl der Parasitämieverlauf bei beiden Tieren ähnlich war. Mit Seren des Rindes F1 war die Migration der Granulozyten im Beobachtungszeitraum an fast allen Tagen gehemmt, während der Verlauf der Migrationskurve des Tieres K2 eher dem des als trypanotolerant einzustufenden Tieres F2 entsprach. Der Parasitämieverlauf zeigt, daß sich in den beiden Gruppen dieser Versuchsreihe (Deutsches Fleckvieh und F_1-Kreuzungen aus Deutschem Fleckvieh x N'Dama) je ein für die Trypanosomeninfektion voll empfängliches Rind

und je ein Rind mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Trypanosomen befand.

Die in der dritten Versuchsreihe mit klonierten T.congolense infizierten Dahomey-Rinder D4 (3.Versuchsreihe), D5 und D6 (Abb.17, 18 und 19) waren alle voll empfänglich für die Trypanosomeninfektion. Der Parasitämieverlauf war bei diesen Tieren sehr ähnlich. Der Verlauf der Migrationskurven war jedoch in dieser Versuchsreihe ebenfalls unterschiedlich. Bei den Tieren D4 und D5 traten wesentlich größere Schwankungen der Migrationswerte auf als bei dem Rind D6. Die Ergebnisse in allen drei Versuchsreihen zeigen damit, daß ein Zusammenhang zwischen ausgeglichenem Migrationskurvenverlauf und der Fähigkeit, die Höhe der Parasitämie zu begrenzen, bei den erstmals mit T.congolense infizierten Tieren nicht gegeben ist.

In der dritten Versuchsreihe waren noch zwei weitere Dahomey-Rinder, D7 (Abb.20) und D8 (Abb.21) mit T.brucei infiziert. Die Migrationshemmungen bei dem Rind D7 waren, wie oben erwähnt, eindeutig durch heterophile, agglutinierende Antikörper bedingt. Die Migrationskurve des Rindes D8 fiel durch ihren ausgeglichenen Verlauf auf. Bei diesem Tier konnten nur mit Seren der Tage 25 und 26 nach Infektion Hemmungen der Migration beobachtet werden. Dies könnte mit der im Vergleich zu T.congolense geringeren Pathogenität von T.brucei für das Rind zusammenhängen (GEE 1982). Obwohl sich eine zu Infektionen mit T.congolense

vergleichbar hohe erste Parasitämie entwickelte, blieben die Migrationswerte im Normbereich. Aus dem starken Abfall der Parasitämie am 16.Tag mit anschliessenden niedrigen Parasitenzahlen bei gleichzeitiger Ausgeglichenheit der Migrationskurve könnte man auf einen ähnlichen Zusammenhang wie bei den mit T.congolense reinfizierten Tieren schließen. Von T.brucei ist jedoch bekannt, daß es einen ausgesprochenen Gewebstropismus zu verschiedenen Organen und speziell für das zentrale Nervensystem besitzt (MANSFIELD u. KREIER 1972). Wahrscheinlich ist der Rückgang der Parasitämie und die anhaltend niedrigen Parasitenzahlen im Anschluß daran bei diesen Tieren deshalb nicht allein auf die Eliminierung der Trypanosomen durch den Wirt zurückzuführen, sondern auch auf das Auswandern der Parasiten aus der Blutbahn ins Gewebe. T.congolense wird im Gegensatz dazu als streng intravasaler Parasit angesehen (MANSFIELD u. WALLACE 1974). Es ist durchaus möglich, daß bei T.brucei-Infektionen die gleichen Faktoren, die bei T.congolense-Infektionen im Serum auftreten, lokal gebildet werden, z.B. in der Cerebrospinalflüssigkeit, und dort auch nachgewiesen werden könnten. Eine unterschiedliche Reaktion des Immunsystems bei Infektionen mit T.brucei bzw. T.congolense vermuten auch MANSFIELD u. KREIER (1972).

Eine direkte Korrelation der Migrationswerte zu den Parasitenzahlen konnte weder bei den reinfizierten, noch bei den erstinfizierten Rindern festgestellt werden. Unabhängig vom Verlauf der Migrationskurve war bei erst- und reinfi-

zierten Rindern auch die Länge der Präpatenzzeit und die Höhe der ersten Parasitämie. Eine Beteiligung des zellulären Immunsystems an Abwehrvorgängen bei der Trypanosomiasis kann jedoch allein auf Grund der Beeinflussung der Granulozyten, einem Teil des zellulären Immunsystems, durch im Serum infizierter Rinder vorhandene Faktoren als gegeben angesehen werden. Eine Begrenzung der Höhe der Parasitämie vorwiegend durch das zelluläre Immunsystem kann wegen der polyfaktoriellen Beeinflussung der Granulozytenmigration aus den vorliegenden Untersuchungen weder postuliert noch ausgeschlossen werden. Der mit der polyfaktoriellen Beeinflussung der Granulozytenmigration zusammenhängende individuelle Verlauf der Migrationskurven läßt keine Schlüsse darüber zu, ob eine Migrationshemmungsaktivität im Serum trypanosomeninfizierter Rinder als ein Ausdruck für die Immunkompetenz eines Wirtstieres zu werten ist oder als ein Ausdruck nicht nur der Hemmung der Granulozytenmigration sondern einer Hemmung der zellulären Immunität ganz allgemein.

Eine Korrelation der Migrationswerte zum Verlauf der im ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) und IFAT (Indirekter Fluoreszenz Antikörper-Test) ermittelten Antikörpertiterkurven (WILLBERG 1983) konnte nicht festgestellt werden. Damit wird die Vermutung bestätigt, daß die in den vorliegenden Untersuchungen ermittelten Migrationshemmungen bzw. -stimulierungen nicht oder zumindest nicht allein durch spezifische, gegen Trypanosomen

gerichtete Antikörper bzw. damit im Zusammenhang gebildete Immunkomplexe des humoralen Systems verursacht sind, sondern daß Mediatorstoffe aus dem zellulären System eine wichtige Rolle bei der Regulation der Granulozytenmigration spielen. Dabei muß allerdings bedacht werden, daß in den oben angeführten Tests für die Antikörperbestimmung nur ein Teil der spezifischen, gegen Trypanosomen gerichteten Antikörper erfaßt wurde (WILLBERG 1983).

Es war naheliegend, zu prüfen, ob die die Migration von Granulozyten beeinflussenden Faktoren in ihrer Gesamtheit einen Einfluß auf die Zahl der Granulozyten im peripheren Blut haben, ähnlich, wie es für Monozyten bzw. Makrophagen im Zusammenhang mit dem MIF-Faktor beschrieben wurde (NELSON u. BOYDEN 1963, YOSHIDA et al. 1969, YOSHIDA u. COHEN 1974). Bei den in der vorliegenden Arbeit mit Trypanosomen infizierten Rindern fielen die Granulozytenzahlen im Verlauf der Infektion generell stark ab. Ein Zusammenhang zwischen den gemessenen Migrationsindexwerten mit den absoluten oder relativen Granulozytenzahlen im Blut konnte aber nicht gefunden werden. Diese Beobachtung deckt sich mit den Feststellungen, die andere Autoren bei anderen Erkrankungen mit LIF- bzw. MIF-Aktivität im Serum gemacht haben (COHEN et al. 1974, FASSAS et al. 1979). Für die bei den mit Trypanosomen infizierten Rindern beobachtete Neutropenie müssen deshalb andere Faktoren verantwortlich gemacht werden.

Eine Beziehung der absoluten bzw. relativen Zahlen an Monozyten oder großen und kleinen Lymphozyten zum Verlauf der Migrationsindexkurve konnte nicht hergestellt werden. BERTOTTO et al. (1981) haben bei Patienten mit infektiöser Mononukleose ebenfalls keine Korrelation zwischen der LIF-Aktivität im Serum und der Anzahl der Gesamtlymphozyten bzw. der Zahl aktivierter, großer Lymphozyten herstellen können. Auch FASSAS et al. (1979) fanden keine Beziehungen zwischen der im Serum von Krebs-Patienten vorkommenden LIF-Aktivität und der Lymphozyten- oder Monozytenzahl. Ein Einfluß von in vivo von aktivierten Lymphozyten gebildeten Serumfaktoren auf die Monozytenzahlen wäre denkbar unter der Voraussetzung, daß auch in vivo die Bildung von LIF und MIF parallel verläuft, wie dies für die in vitro Stimulation von Lymphozyten gezeigt wurde (GAINES et al. 1972, ROCKLIN 1974, HOFFMAN et al. 1977) und endogen gebildetes MIF, wie im Literaturteil ausgeführt, die Anzahl der Monozyten in der Peripherie stark vermindert. Dabei muß aber bedacht werden, daß eine Verringerung der Monozytenzahl bei dem physiologisch ohnehin schon geringen Anteil dieser Zellen am Differentialblutbild schlecht beurteilt werden kann und die Migration der Monozyten bzw. Makrophagen, ähnlich wie die Migration der Granulozyten, ebenfalls durch weitere Faktoren beeinflußt wird (BERGSTRAND 1979, BAER et al. 1978). In der 2. Versuchsreihe stiegen bei allen infizierten Rindern ab Mitte der 3. Infektionswoche die Monozytenzahlen an. Da bei dem

Fleckviehkontrollrind dieser Versuchsreihe die Monozytenzahl zu dieser Zeit ebenfalls zunahm, muß der Anstieg der Monozyten auf andere Einflüsse als die Trypanosomeninfektion zurückgeführt werden. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, daß es in der 3.Versuchsreihe und bei zwei weiteren mit Trypanosomen infizierten Schwarzbunten Rindern im gleichen Beobachtungszeitraum nicht zu einer Zunahme der Monozytenzahlen kam. Eine Korrelation der Migrationswerte besonders mit der Zahl der großen Lymphozyten wäre schließlich theoretisch auch nicht auszuschließen gewesen, da die großen Lymphozyten als eine Form aktivierter Lymphozyten für die in vivo Bildung der mit der zellulären Immunität korrelierten Lymphokine in Frage kommen.

Es ist noch nicht bekannt von welchen Lymphozyten die Faktoren LIF und LEF gebildet werden. Die sich zum Teil widersprechenden Angaben aus der Literatur veranlaßten BENDTZEN u. BENDIXEN (1980) zu der Annahme, daß LIF möglicherweise von einer nur in geringer Zahl vorkommenden, morphologisch nicht differenzierbaren Lymphozytensubpopulation gebildet wird. Die Gesamtzahl kleiner oder großer Lymphozyten im Blut müßte in diesem Fall nicht zwingend mit der Migrationskurve korrelieren, da die Zusammensetzung der Lymphozytenfraktion aus Subpopulationen Schwankungen unterworfen sein kann.

Schließlich besteht noch die Möglichkeit, daß die Faktoren LIF und LEF nicht allein oder nicht primär von lymphoiden Zellen des peripheren Blutes gebildet werden, sondern daß die Produktion dieser Faktoren vorwiegend in den immunkompetenten Organen Lymphknoten, Milz und/oder Thymus vonstatten geht. So haben HOFFMAN et al. (1975) in Untersuchungen mit Lymphozyten von Meerschweinchen, die mit verschiedenen Antigenen sensibilisiert waren, beobachtet, daß Lymphknotenzellen nach Stimulierung mit dem entsprechenden Antigen eine wesentlich höhere LIF-Aktivität produzierten als Milz- und Blutlymphozyten. Eine unterschiedliche Reaktion von Lymphozyten verschiedener Organe auf eine mitogene Stimulation haben EMERY et al. (1980) auch während einer Trypanosomeninfektion bei Mäusen beobachtet. Während Lymphknotenzellen eine normale Funktion zeigten, war die Funktion der Milzzellen supprimiert.
Die Möglichkeit unterschiedlich starker Bildung von Lymphokinen in verschiedenen Organen wird auch von NETA et al. (1981) diskutiert. Migrationshemmende Lymphokine wären dann im Serum vermutlich in weit geringeren Konzentrationen vorhanden, als am Ort ihrer Bildung. Eine Lymphokinaktivität im Serum wäre dann trotz erhaltener Funktionsfähigkeit der Zellen in den immunkompetenten Organen nur an Tagen maximaler Produktion meßbar. Nach Infektion mit verschiedenen Trypanosomenspezies kam es bei Maus, Ratte und Kaninchen (MURRAY et al. 1974, CORSINI et al. 1977, MOULTON u. COLEMAN 1977, MAYOR-WITHEY et al. 1978, MORRISON et al. 1978) und bei Rindern nach Infektion

mit T.vivax (MASAKE u. MORRISON 1981) zu einer starken Proliferation von Lymphoblasten in Milz, Lymphknoten und Thymus. In den vorliegenden Untersuchungen wurden derartige Veränderungen in der Lymphoblastenzahl im peripheren Blut nicht beobachtet. MORRISON et al. (1978) nehmen an, daß bei Infektionen mit intravasal lebenden Parasiten, wie T.congolense, die Immunreaktionen hauptsächlich in der Milz mit ihren veschiedenen Immunzellen ablaufen. Damit bestehen Anhaltspunkte dafür, daß bei der Trypanosomiasis zelluläre Immunreaktionen ablaufen. Die damit verbundene Bildung von Lymphokinen findet möglicherweise in den immunologisch kompetenten Organen statt und entzieht sich damit teilweise einem direkten Nachweis im Serum.

Es muß noch erwähnt werden, daß diese experimentellen Trypanosomeninfektionen nicht den natürlichen Bedingungen entsprechen. Lokale bzw. systemische zelluläre Immunreaktionen laufen nach natürlichen Infektionen mit zyklischen Übertragungsformen von Trypanosomen möglicherweise anders ab, als nach einer Infektion mit Blutstromformen. Unter natürlichen Bedingungen sind die Rinder außerdem ständigen Re- und Neuinfektionen mit unterschiedlichen Trypanosomenarten ausgesetzt. Die Reaktionen des zellulären Immunsystems unter solchen Bedingungen zu untersuchen, muß weiteren Arbeiten vorbehalten bleiben.

6. Zusammenfassung

Zum Nachweis von Leukozytenmediatoren wurde der Migrationstest im Agarose-Mikrodroplet-Verfahren eingesetzt. Als Zielzellen dienten Schweinegranulozyten. Dieses Testverfahren hat sich als eine zuverlässige Untersuchungsmethode zur Erfassung des jeweiligen Funktionszustandes des zellulären Immunsystems erwiesen. Gepoolte Schweinegranulozyten sind als Zielzellen zum Nachweis von Mediatoren besonders geeignet und in ausreichender Menge zu gewinnen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Blutseren von mit Trypanosomen infizierten Rindern auf ihre Aktivität im Granulozytenmigrationstest untersucht. Nachgewiesen wurde in diesen Rinderseren eine Hemmaktivität gegenüber heterologen Zielzellen, die auf das Vorhandensein von Leukozytenmediatoren schließen läßt. Die Verlaufskurven im Migrationstest sind Ausdruck für die Wechselwirkungen zwischen hemmenden und stimulierenden Faktoren und somit bietet das verwendete Testsystem eine Möglichkeit, Teilaspekte des Funktionszustandes des komplexen zellulären Immunsystems zu beobachten.

Zwischen der Infektion der Versuchsrinder mit Trypanosomen und dem Auftreten von Faktoren mit hemmender bzw. stimulierender Wirkung auf die Migration von Granulozyten im Serum dieser Rinder besteht ein ursächlicher Zusammenhang.

In den Seren aller mit Trypanosomen infizierter Rinder wurde eine Migrationshemmaktivität frühestens 4 Stunden nach der Infektion nachgewiesen. Die unterschiedlichen Werte der Migrationsindices bei den einzelnen Tieren geben Anhaltspunkte für eine individuell verschiedene immunologische Auseinandersetzung des Wirtsorganismus mit den Trypanosomen. Für eine jedem Individuum eigene Abwehrleistung spricht auch das Auftreten der Hemmaktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion.

Die Verlaufskurven der Migrationsindices zeigen grundsätzliche Unterschiede bei erst- und reinfizierten Dahomey-Rindern. Der Grad der Hemmung war bei den reinfizierten Rindern deutlich geringer als bei den erstinfizierten. Dieses Ergebnis kann als eine Modulation des Immunsystems durch die wiederholte Infektion mit dem gleichen Trypanosomenstamm gewertet werden.

Bei unterschiedlichem Parasitämieverlauf traten in verschiedenen Rassen individualspezifische Hemmungsaktivitäten im Serum auf. Dies spricht für eine individuelle Ausprägung zellvermittelter Abwehrmechanismen, die in den untersuchten Rindern unterschiedlicher Rassen beobachtet wurde. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geht hervor, daß bei der Auseinandersetzung mit einer Trypanosomeninfektion zelluläre Immunreaktionen beteiligt sind.

7. Summary

LEUCOCYTE MEDIATORS IN BLOOD SERUM OF
TRYPANOSOME INFECTED CATTLE

Mediators of cellular immunity were studied employing a granulocyte migration test in the agarose microdroplet assay. Pooled porcine granulocytes were used as target cells.

This assay proved to be a reliable method in evaluating the current disposition of the cellular immune system. Porcine granulocytes were found to be ideal target cells readily available in sufficient numbers.

Blood serum from cattle experimentally infected with trypanosomes was tested for its activity influencing granulocyte migration. Serum of all infected animals displayed migration inhibitory activity for heterologous target cells implying the presence of mediators of cellular immunity. Values of migration indices expressing reciprocal events of inhibitory and stimulating factors, allowed to study at least some aspects of the very complex cellular immune system and its functioning.

The observed differences in migration values in serum of each animal speak for an individual immunological capacity to defy trypanosome infections. The variability in occurence of the first inhibitory activity after infection supports the view of individual responsiveness. Distinct differences in migration values were observed in Dahomey cattle after primary and secondary challenge with trypanosomes. Serum from reinfected animals exhibited a marked decrease in inhibitory activity than serum from primed ones. These observations suggest a modulation of the individual immune response after multiple challenge with trypanosomes of the same strain.

All animals under study developed a different level of parasitemia, and serum from challenged animals, irrespective of the breed, exhibited a variable inhibitory activity being specific for the individual animal. Results obtained in this study demonstrate an apparent involvement of cell mediated immune responses to trypanosome infections.

8. Literaturverzeichnis

Adelman, N., S. Cohen, T. Yoshida (1978):
Strain variations in murine MIF-production.
J.Immunol. 121, 209 - 212

Agrup, G., B.Källén, O. Nilsson (1980):
Two-step leukocyte migration in agarose technique.
Int.Archs.Allergy appl. Immunol. 63, 105 - 112

Allt, G., E.M.E. Evans, D.H.L. Evans, G.A.T. Targett (1971):
Effect of infection with trypanosomes on the development of experimental allergic neuritis in rabbits.
Nature (London) 233, 197 - 199

Arvilommi, H., L. Räsänen (1975):
Spontaneous lymphokine synthesis by human blood mononuclear cells.
Nature 257, 144 - 146

Askonas, B.A., A.C. Corsini, C.E. Clayton, B.M. Ogilvie (1979):
Functional depletion of T- and B-memory cells and other lymphoid cell subpopulations during trypanosomiasis.
Immunology 36, 313 - 321

Assoku, R.K.U., I.R. Tizard (1978):
Mitogenicity of autolysates of Trypanosoma congolense.
Experientia 34, 127 - 128

Baer, R., K. Vogt, S. Lazary, C. Geczy, A.L. de Weck (1978):
Lymphokines.VI.Factors in human and other heterologous sera inhibiting the migration of guinea pig macrophages.
Z.Immun.-Forsch. 155, 130 - 143

Bellina, L., A. Salerno (1981):
Chicken buffy coat leucocytes as indicator cells for human leucocytes migration inhibitory factor.
J.Immunol. Meth. 43, 277 - 281

Bendixen, G., M.Soborg (1969):
A leucocyte migration technique for in vitro detection of cellular (delayed type) hypersensitivity in man.
Dan.Med.Bull. 16, 1 - 6

Bendtzen, K. (1976)
Some physicochemial properties of human leucocyte migration inhibitory factor (LIF).
Acta Pathol.Microbiol.Scand.Sect.C 84, 471 - 476

Bendtzen, K., G.Bendixen (1980):
Inflammatory non-antibody lymphocytic mediators (lymphokines).
Allerg.Immunol. 26, 293 - 309

Bergstrand, H. (1979):
Lymphocyte derived factors affecting cell migration in vitro.
Allergy 34, 69 - 96

Bertotto, A., G.Stagni, F.Sonaglia, D.Caprino, A.Velardi (1980):
Cell-mediated immunity in RSV bronchiolitis.
J.Pediat. 97,2, 334 - 335

Bertotto, A., D. Caprino, R. Vaccaro, F. Sonaglia (1981):
Serum migration-inhibitory activity in children with acute infectious mononucleosis .
Clin. Immunol. Immunopathol. 19, 314 - 318

Bertrams, J., Ch. Rittner (1981):
Der HLA-Komplex. Immungenetische Steuerzentrale des Menschen.
Dtsch. med. Wschr. 106, 952 - 958

Botto, H.G., H. Gauthier, P. Pouillart, M. Bruley-Rosset, P. Hughenin (1977):
Correlation of delayed hypersensitivity and leukocyte migration inhibition factor in the serum of cancer patients.
Eur. J. Cancer 13, 329 - 332

Bryant, R.E., R.M. Desprez, M.H. Vanway, D.E. Rogers (1966):
Studies on human leukocyte mobility.I. Effects of alterations in pH, electrolyte concentration and phagocytosis on leukocyte migration, adhesiveness and aggregation.
J. Exp. Med 124, 483 - 499

Carlson, G.P., J.J. Kaneko (1973):
Isolation of leukocytes from bovine peripheral blood.
Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 142, 853 - 856

Caruso, C., L. Bellina (1983)
B 8, DR 3 antigens and production of human leucocyte migration inhibitory factor (LIF) by mononuclear cells stimulated with concanavalin A (Con A).
Tissue Antigens 22, 167 - 169

Chess, L., R.E. Rocklin, R.P. Mac Dermott, J.R. David, S.F. Schlossman (1975):
Leukocyte inhibitory factor (LIF): Production by purified human T und B lymphocytes.
J.Immunol. 115, 315 - 317

Clausen, J.E. (1971):
Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leukocytes in agarose medium.
Acta Allergologica 26, 56 - 80

Clausen, J.E. (1972):
Migration inhibitory effect of cell-free supernatants from mixed human lymphocyte cultures.
J.Immunol 108, 453 - 459

Clausen, J.E. (1973a):
Leukocyte migration agarose technique: some technical details.
Acta Allergologica 28, 351 - 364

Clausen, J.E. (1973 b):
Migration inhibitory effect of cell-free supernatants from tuberculin-stimulated cultures of human mononuclear leucocytes demonstrated by a two-step MIF-agarose assay.
J.Immunol. 110, 546 - 551

Cochran, A.J., G. Klein, R. Kiessling, P. Gunven (1973):
Migration-inhibiting effect of sera from patients with Burkitt's Lymphoma.
J.Nat.Cancer Inst. 51, 1431 - 1436

Cochran, A.J., R.M.Mackie, C.E. Ross, L.J. Ogg, A.M. Jackson (1976):
Leukocyte migration inhibition by cancer patients' sera.
Int. J. Cancer 18, 274 - 281

Cohen, S., B. Fisher, T. Yoshida, R.E. Bettigole (1974):
Serum migration-inhibitory activity in patients with lymphoproliferative diseases.
New Engl.J.Med. 290, 882 - 886

Corsini, A.C., C.E. Clayton, B.A. Askonas, B.M. Ogilvie (1977):
Suppressor cells and loss of B cell potential in mice infected with Trypanosoma brucei.
Clin.exp.Immunol. 29, 122 - 131

Dooley, D.C., T. Takahashi (1981):
The effect of osmotic stress on the function of the human granulocyte.
Exp. Hematol. 9, 731 - 741

Emery, D.L., P.W. Wells, T. Tenywa (1980):
Bovine trypanosomiasis: Specific transformation in vitro of leukocytes from cattle infected or immunized with trypanosoma congolense.
Exp.Parasitol 50, 358 - 368

Fahlbusch, B., G.Dornberger (1979):
Studies of assay conditions for macrophage migration from an agarose droplet.
Acta biol.med.germ. 38, 1453 - 1460

Fahlbusch, B., W. Zschiesche, W.Römer (1981):
Charakterisation of tilorone-induced mouse migration inhibitory factor by affinity chromatography and isoelectric focusing.
Acta biol.med.germ. 40, 147 - 152

Fahlbusch, B. (1982):
Persönliche Mitteilung
Akademie der Wissenschaften der DDR.
Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena.

Fassas, A., M. Bruley-Rosset (1979):
Serum leukocyte inhibitory factor in cancer patients (serum LIF).
In: Bonnadona G., G.Mathé, S.Salmon: Adjuvant Therapies and Markers of Post-surgical Minimal Residual Disease.
88 - 92, Springer-Verlag, Heidelberg.

Fassas, A. M. Bruley-Rosset, C. Guibout, C. Jasmin (1979):
Serum migration-inhibitory activity in patients with acute leukemia and early leukemic lymphosarcoma.
Clin.Immunol.Immunopathol. 14, 368 - 378

Federlin, K., R.N. Maini, A.S. Russell, D.C. Dumonde (1971):
A micro-method for peripheral leucocyte migration in tuberculin sensitivity.
J.clin.Path. 24, 533 - 536

Fenton, E.L., M.M.Taylor (1975):
A modified, quantitative assay for substances that inhibit the migration of macrophages and other leukocytes: The use of Concanavalin A as a reference reagent.
J.Immunol.Methods 7, 123 - 142

Ferrante, A., Y.H. Thong (1978):
A rapid one-step procedure for purification of mononuclear and polymorphonuclear leukocytes from human blood using a modification of the Hypaque-Ficoll technique.
J.Immunol.Methods 24, 389 - 393

Ferrante, A., Y.H. Thong (1980):
Simultaneous preparation of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from horse blood on ficoll-hypaque medium.
J.Immunol.Methods 34, 279 - 285

Flanagan, T.D., T. Yoshida, S. Cohen (1973):
Production of macrophage migration inhibition factors by virus-infected cell cultures.
Infect.Immun. 8, 145 - 150

Fox, R.A., D.S. Gregory, J.D. Feldman (1974):
Migration inhibition factor (MIF) and migration stimulation factor (MSF) in fetal calf serum.
J.Immunol. 112, 1861 - 1866

Gaines, J.D., F.G. Araujo, J.L. Krahenbuhl, J.S.Remington (1972):
Simplified in vitro method for measuring delayed hypersensitivity to latent intracellular infection in man (toxoplasmosis).
J.Immunol. 109, 179 - 182

Gee, A.L.W. de (1982):
Host parasite relationships in Trypanosoma (duttonella) vivax with special reference to the influence of antigenic variation.
Vet. Quart. 4, 32 - 35

Geißelbrecht, K.H. (1983):
Klinische Untersuchungen an experimentell mit Trypanasoma congolense infizierten Rindern verschiedener Rassen.
Inaugural-Dissertation.
Universität München.

Gill, T.J., H.W. Kunz (1980):
The role of regional differences in the major histocompatibility complex in the production during pregnancy of a serum factor inhibiting macrophage migration.
Journal of Immunogenetics 7, 157 - 165

Glasser, L., R.L. Fiederlein (1979):
Neutrophil migration under agarose.
Quantitation and variables.
Amer.J.Clin.Path. 72, 956 - 962

Gray, G.D., K.A. Knight, R.D. Nelson, M.J. Herron (1982):
Chemotactic requirements of bovine leukocytes.
Am.J.Vet.Res. 5, 757 - 759

Greenwood, B.M., H.C. Whittle, D.H. Molyneux (1973):
Immunosuppression in Gambian trypanosomiasis.
Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.67, 846 - 850

Greenwood, B.M., A.J. Oduloju (1978):
Mitogenic avtivity of an extract of Trypanosoma gambiense.
Trans.R.Soc.trop.Med.Hyg. 72, 408 - 411

Gutekunst, D.E. (1979):
Cellular immunity shown in pseudorabies virus-infected pigs by leukocyte migration-inhibition procedure.
Am.J.Vet.Res. 40, 66 - 68

Harrington, J.T., P. Stastny (1973):
Macrophage migration from an agarose droplet:Development of a micromethod for assay of delayed hypersensitivity.
J.Immunol. 110, 752 - 759

Hay, J.B., P.J. Lachmann, Z. Trnka (1973):
Kinetic studies on the production of sensitized lymphocytes and soluble lymphnode factors.
In: Daguillard F.: Proceedings of the 7th Leucocyte Culture Conference, 341 - 348, Academic Press, New York.

Heinrich, H.D. (1984):
Der klinische Verlauf von wiederholten T.congolense- und T.brucei - Infektionen bei Dahomey-Rindern.
Inaugural-Dissertation.
Universität München.

Hörchner, F. (1983):
Neue Erkenntnise in der Pathogenese und Bekämpfung der Trypanosomiasis bei Haustieren. Gemeinsame Tagung der Deutschen Tropenmedizinischen Gesellschaft, der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie und der Schweizerischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie, Garmisch-Partenkirchen, 22.-23. April 1983.

Hoffman, P.M., L.E. Spitler, M. Hsu, H.H. Fudenberg (1975):
Leucocyte migration inhibition in agarose. Cell. Immunol. 18, 21 - 30

Hoffman, P.M., L.E. Spitler, M. Hsu (1976):
Leucocyte-migration inhibition in guinea pigs. I. Correlation with skin test reactivity and macrophage-migration inhibition. Cell.Immunol. 21, 358 - 363

Hoffman, P.M., D.M. Hanes, M. Horsmanheimo, H.H. Fudenberg (1977):
Leucocyte migration in guinea pigs.II. Partial characterization of a leukocyte migration inhibitory factor distinct from macrophage migration inhibitory factor. Cell.Immunol. 30, 92 - 99

Hollander, den,F.C., J.K. van Lieshout, A.H.W.M.Schuurs (1981):
Statistically designed assay of migration-inhibitory activity in lymphokine preparations.
Immunopharmacology 3, 161 - 178

Holmes, P.H., E.Mammo, A.Thomson, P.A.Knight, R.Lucken, P.K.Murray, M.Murray, F.W.Jennings, G.M.Urquhart (1974):
Immunosuppression in bovine trypanosomiasis. Vet.Rec. 95, 86 - 87

Houba, V., K.N. Brown, A.C. Allison (1969):
Heterophile antibodies, M-antiglobulin and immunoglobulins in experimental trypanosomiasis.
Clin.Exp.Immunol. 4, 113 - 123

Hübner, L., E.M.Kniep, H.Laukel, C.Sorg, H.Fischer, W.D.Gassel, K.Havemann, B.Kickhöfen, M.L.Lohmann-Matthes, A.Schimpl, E.Wecker (1980):
Chemical characterization of macrophage cytotoxicity factor, macrophage migration inhibitory factor, T-helper cell-replacing factor and colony-stimulating factor from culture supernatants of Concanavalin A-stimulated murine spleen cells.
Immunobiol. 157, 169 - 178

Jokipii, L., A.M.M. Jokipii (1974):
Determination of the migration area in macrophage migration inhibition assay: a comparison of the whole with the dense part of the fan.
J.Immunol. Methods 5, 83 - 90

Katz, D.H. (1982):
The immune system: An overview.
In: Stites D.P., Stobo J.D., Fudenberg H.H., Wells J.V., Basic and clinical immunology 13 - 20, Lange Medical Publications, Los Altos, California.

Kotkes, P., E. Pick (1975):
Studies on the inhibition of macrophage migration induced by soluble antigen-antibody complexes.
Clin.Exp.Immunol 19, 105 - 120

Lenhard, V. (1983):
Verwendung eines Stimulatorzellpools in der gemischten Lymphozytenreaktion (PMLR, Pooled Mixed Lymphocyte Reaction): Methodische Standardisierung und diagnostische Anwendungsmöglichkeiten.
Lab.med. 7, 17 - 22

Levine, R.F., J.M.Mansfield (1981):
Genetics of resistance to African trypanosomes: Role of the H-2 locus in determining resistance to infection with Trypanosoma rhodesiense.
Infect.Immun. 34, 513 - 518

Mac Kenzie, P.K.J., J.G.Cruickshank (1973):
Phagocytosis of erythrocytes and leucocytes in sheep infected with Trypanosoma congolense.
Res.Vet.Sci. 15, 256 - 262

Mansfield, J.M., J.P. Kreier (1972):
Tests for antibody- and cell-mediated hypersensitivity to trypanosome antigens in rabbits infected with Trypanosoma congolense.
Infect. Immunity 6, 62 - 67

Mansfield, J.M., J.H. Wallace (1974):
Suppression of cell-mediated immunity in experimental African trypanosomiasis.
Infect.Immun. 10, 335 - 339

Mansfield, J.M. S.A. Craig, G.T. Stelzer (1976):
Lymphocyte function in experimental African trypanosomiasis. Mitogenie effects of trypanosome extracts in vitro.
Infect.Immun. 14, 976 - 981

Masake, R.A., W.I.Morrison (1981):
Evaluation of the structural and functional changes in the lymphoid organs of Boran cattle infected with Trypanosoma vivax.
Am.J.Vet.Res. 42, 1738 - 1746

Masake, R.A., T.W.Pearson, P.Wells (1981):
The in vitro response to mitogens of leukocytes from cattle infected with Trypanosoma congolense.
Clin.Exp.Immunol. 43, 583 - 589

Mayor-Withey, K.S., C.E.Clayton, G.E.Roelants, B.A.Askonas (1978):
Trypanosomiasis leads to extensive proliferation of B, T and null cells in spleen and bone marrow.
Clin.exp.Immunol. 34, 359 - 363

Mayr, A., G.Eißner, B.Mayr-Bibrack (1983):
Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin.
Parey Verlag, Hamburg-Berlin

Molnar, L., J.Leibinger, J.M.Balo-Bangar, I.Racz (1981):
A rapid centrifugation method for the isolation of polymorphonuclear leukocytes from human blood.
Acta Physiol.Acad. Sci.Hung. 57, 225 - 260

Morrison, W.I., G.E.Roelants, K.S.Mayor-Withey, M.Murray (1978)
Susceptibility of inbred strains of mice to Trypanosoma congolense:correlation with changes in spleen lymphocyte populations.
Clin.Exp.Immunol. 32, 25 - 40

Moulton, J.E., J.L.Coleman, (1977):
Immunosuppression in deer mice with experimentally induced trypanosomiasis.
Am.J.Vet.Res. 38, 573 - 579

Murray, P.K., P.W.Jenning, M.Murray, G.M.Urquart (1974):
The nature of immunosuppression in Trypanosoma brucei infections in mice. II. The role of the T and B lymphocytes.
Immunol. 27, 825 - 840

Murray, M., W.I.Morrison, P.K.Murray, D.J.Clifford, J.C.M.Trail (1979):
Trypanotolerance - a review.
World Animal Review 31, 2 - 12

Murray, M., W.J.Morrison, D.D.Whitelaw (1982):
Host Susceptibility to African trypanosomiasis: Trypanotolerance.
Adv.Parasit. 21, 2 - 68

Naylor, P.F., T.W.A. Little (1975):
A simple method for isolating leukocytes from bovine blood and their separation into lymphocyte and granulocyte fraction.
Res.Vet.Science 18, 336 - 337

Nelson, D.A., S.V. Boyden (1963):
The loss of macrophages from peritoneal exudates following the injection of antigens into guinea-pigs with delayed-type hypersensitivity.
Immunology 6, 264 - 271

Neta, R., S.B. Salvin (1980):
In vivo release of lymphokines in different strains of mice.
Cell.Immunol. 51, 173 - 178

Neta, R., S.B.Salvin (1981):
Mechanisms in the in vivo release of lymphokines: Relationship of high and low responsiveness to other parameters of the immune response.
Infection and Immunity 34, 160 - 165

Neta, R., S.B.Salvin, M.Sabaawi (1981):
Mechanisms in the in vivo release of lymphokines.I.Comparative kinetics in the release of six lymphokines in inbread strains of mice.
Cell.Immun. 64, 203 - 219

Neta, R., S.B.Salvin, D.C.Shreffler (1982):
Mechanisms in the in vivo release of lymphokines. VI.Studies with mice congenic at the H-2 region.
Transplantation 33, 102 - 103

Neville, M.F., H.W.Lischner (1977):
Lymphokine production by K-cells upon interaction with antigen-antibody-complexes.
J.Retic.-endothel.Soc. 22, 23 - 30

Otto, F. (1970):
Granulozytenisolierung aus dem Blut des Menschen und der Tiere.
Blut 21, 290 - 294

Pearson, T.M., G.Roelants, L.B.Lundin, K.S.Mayor-Whithey (1978):
Immune depression in trypanosome-infected mice. I.Depressed T-immune responses.
Eur.J.Immunol. 8, 723 - 727

Pearson, T.W., G.E.Roelants, L.B.Lundin, K.S.Mayor-Whithey (1979):
Suppressor cells in Trypanosoma-congolense infected mice.
Adv.Exp.Med.Biol. 114, 655 - 660

Petrini, M., A.Azzara, R.Polidori, N.L.Vatteroni, F.Caracciolo, G.Carulli, F.Ambrogi (1982):
Serum factors inhibiting some leukocytic functions in Hodgkin's disease.
Clin.Immunol.Immunopathol. 23, 124 - 132

Pick, E. (1976):
Lymphokines: Physiologic control and pharmacological modulation of their production and action.
In:Hadden J.W., Coffey R.G., Sperafico F.: Immunopharmacology, 163 - 202, Plenum Medical Book Company, New York.

Rocklin, R.E. (1974):
Products of activated lymphocytes: leukocyte inhibitory factor (LIF) distinct from migration inhibitory factor (MIF).
J.Immunol. 112, 1461 - 1466

Rocklin, R.E. (1975):
Partial characterization of leukocyte inhibitory factor by Concanavalin A-stimulated human lymphocytes (LIF Con A).
J.Immunol. 114, 1161 - 1165

Roelants, G.E., T.W.Pearson, K.S.Mayor-Whithey, L.B.Lundin (1979):
Immune depression in Trypanosoma congolense-infected mice.
Adv.Exp.Med.Biol. 114, 661 - 666

Rolle, M., A.Mayr (1978):
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.
Enke Verlag, Stuttgart

Roth, J.A., M.L.Kaeberle (1981):
Evaluation of bovine polymorphonuclear leukocyte function.
Vet.Immunol.Immunopathol. 2, 157 - 174

Rurangirwa, F.R., H.Tabel, G.J.Losos, I,R.Tizard (1980):
Immunosuppression in bovine trypanosomiasis. The establishment of "memory" in cattle infected with T.congolense and the effect of past infection serum on in vitro (^{3}H)-thymidine uptake by lymphocytes and on leukocyte migration.
Tropenmed.Parasit. 31, 105 - 110

Ruscetti, S.K., T.J.Gill, S.B.Salvin, J.Herrman, C.W. Bailie (1976):
Production of migration inhibitory factor in inbred rats.
Int.Archs. Allergy appl.Immun. 52, 417 - 421

Sallinger, U. (1984):
Über den Nachweis eines Lymphozytenmediators beim Schwein im Granulozytenmigrationstest. Inaugural-Dissertation. Universität München.

Selkirk, M.E., B.M.Ogilvie, T.A.E.Platts-Mills (1981):
Activation of human peripheral blood lymphocytes by a trypanosome-derived mitogen.
Clin.exp.Immunol. 45, 615 - 620

Soborg, M., G.Bendixen (1967):
Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity.
Acta Med.Scand. 181, 247 - 256

Soborg, M. (1968):
In vitro migration of peripheral human leukocytes in cellular hypersensitivity.
Acta Med.Scand. 184, 135 - 139

Sollod, A.E., G.H.Frank (1979):
Bovine trypanosomiasis: Effect on the immune response of the infected host.
Am. J.Vet.Res. 40, 658 - 664

Terry, R.J. (1976):
Innate resistance to trypanosome infections.
In:Lumsden and Evans:Biology of the Kinetoplastidae 1,477 - 492.Academic Press, London, New York

Tizard, I.R., M.A. Soltys (1971):
Cell-mediated hypersensitivity in rabbits infected with Trypanosoma brucei and Trypanosoma rhodesiense.
Infect.Immunity 4, 674 - 677

Torisu, M., T.Yoshida, S.Cohen (1975):
Serum migration inhibitory activity in patients with posttransplantation hepatic dysfunction.
Clin.Immunol.Immunopathol. 3, 369 - 376

Trischmann, T.M., B.R.Bloom (1982):
Genetics of murine resistance to Trypanosoma cruzi.
Infect.Immun. 35, 546 - 551

Valli, V.E.O., C.M.Forsberg (1976):
The pathogenesis of anaemia in calves due to tryponosoma congolense.
IDRC Bovine Trypanosomiasis Project 1974 - 1976; Pathology Report

Van den Ingh, T.S.G.A.M., D.Zwart, A.S.J.P.A.M. Van Miert, J.J.H.Schotman (1976):
Clinico-pathological and pathomorphological observations in Trypanosoma vivax infection in cattle.
Vet.Parasitol. 2, 237 - 250

Waksman, B.H., Y.Namba (1976):
Commentary on soluble mediators of immunologic regulation.
Cell.Immunol. 21, 161 - 176

Watanuki, M., S.Haga (1977):
The statistical distribution of macrophage migration distance and its application to MIF-Test.
J.Immunol.Meth. 15, 331 - 341

Weisbart, R.M., R.Bluestone, L.S.Goldberg, C.N.Pearson (1974):
Migration enhancement factor, a new lymphokine.
Proc. Natl.Acad.Sci.USA 71, 875 - 879

Weisbart, R.H., A.J.Lusis, A.Kacena, L.Spolter, P.Eggena, D.W.Golde (1982):
Neutrophil migration inhibition factor from T lymphocytes (NIF-T): Partial purification by antibody affinity chromatography and further characterization.
Clin.Immunol.Immunopathol 22, 408 - 418

Willberg, G. (1983):
Serologische Untersuchungen an experimentell mit Trypanosoma congolense infizierten Rindern verschiedener Rassen.
Inaugural-Dissertation.
Universität München.

Woronick, C.L., J.Malnick, E.G.Maderazo (1981):
Cell-directed inhibitor of human leukocyte locomotion.
J.Lab.Clin.Med. 98, 58 - 67

Wrightsman, R., S.Krassner, J.Watson (1982):
Genetic control of responses to Trypanosoma cruzi in mice: Multiple genes influencing parasitemia and survival.
Infect.Immun. 36, 637 - 644

Yamamoto, K., Y.Takahashi (1971):
Macrophage migration inhibition by serum from desensitized animals previously sensitized with tubercle bacilli.
Nature/New Biology 233, 261 - 263

Yoshida, T., B.Benacerraf, R.T.Mc Cluskey, P.J.Vassalli (1969):
The effect of intravenous antigen on circulating monocytes in animals with delayed hypersensitivity.
J.Immunol. 102, 804 - 807

Yoshida, T., S.Cohen (1974):
Lymphokine activity in vivo in relation to circulating monocyte levels and delayed skin reactivity.
J.Immunol. 112, 1540 - 1547

Herrn Professor Dr. DDr.h.c. A.Mayr danke ich herzlich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Institut für Blutgruppen- und Resistenzforschung in Grub.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. D.O. Schmid für die Überlassung des Themas und hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. S.Cwik bin ich für seine stete Bereitschaft, Hilfestellung in allen Fragen zu leisten, zu großem Dank verpflichtet.

Allen Mitarbeitern des Blutgruppeninstituts, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, besonders Frau Dietrich, danke ich für ihren tatkräftigen Beistand.

Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. J.Boch, Vorstand des Instituts für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie in München und seinen Mitarbeitern danke ich für das Bereitstellen der Seren von mit Trypanosomen infizierten Rindern sowie für die Möglichkeit zur Einsichtnahme von Ergebnissen parasitologischer Untersuchungen.

Frau Dr. D.Schendel, Institut für Immunologie der Universität München, danke ich für die Überlassung von lymphokinhaltigen Lymphozytenkulturüberständen.

Frau Dr. B.Fahlbusch, Akademie der Wissenschaften der DDR, Zentralinstitut für Mikrobiologie, Jena, danke ich für wertvolle Hinweise zur Technik des Migrationstestes.

Lebenslauf

Name:	Georg Hauner
Geboren:	6. Dezember 1952 in München
Eltern:	Benno und Maria Hauner
Familienstand:	Verheiratet, ein Kind
Schulen:	Volksschule in Germering
	Max-Planck-Gymnasium in München
Abitur:	23. Juni 1972
Wehrdienst:	2. Okt. 1972 bis 31. Dez. 1973
Studium:	Tiermedizin an der Universität München
	Examen 29. Mai 1980
Approbation:	13. Juni 1980
Berufstätigkeit:	Juli 1980 bis März 1982 Assistent in einer Großtierpraxis
Anfertigung der Dissertation:	Seit April 1982 am Institut für Blutgruppen- und Resistenzforschung in Grub